

Aus dem
Institut für Transfusionsmedizin
der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena

**Untersuchung der möglichen Assoziation eines varianten
CD45RA-Expressionsmusters bei T-Lymphozyten mit der
Entstehung einer idiopathischen dilatativen Kardiomyopathie**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der medizinischen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von **Konstanze Gerlach**
geboren am 13. September 1978 in Schmalkalden

Erster Gutachter: Frau Prof. Dr. med. Dagmar Barz, Jena

Zweiter Gutachter: Herr Prof. Dr. med. Gunter Wolf, Jena

Dritter Gutachter: Herr Prof. Dr. med. Thomas Eiermann, Hamburg

Tag der öffentlichen Verteidigung: 03.November 2009

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
ACE	Angiotensin Converting Enzyme
ADP	Adenosindiphosphat
AICD	Activity induced cell death
AIH	Autoimmunhepatitis
Ak	Antikörper
AT-I	Angiotensin-I
ATP	Adenosintriphosphat
ANA	Antinukleäre Antikörper
AMLA	Antimyolemmaler Antikörper
Bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
C	Cytosin
CD	Cluster of differentiation
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamin-Tetracetat
EF	Ejektionsfraktion
EGF	Epidermal growth factor
EKG	Elektrokardiogramm
ESE	Exon-Splicing-Enhancer
ESS	Exon-Splicing-Silencer
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	Forward-Scatter
G	Guanin

g	Gramm
GH	Growth hormone
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HLA	Humanes Leukozytenantigen
hnRNA	Heterogene nucleäre RNA
HZV	Herz-Zeit-Volumen
IA	Immunadsorption
ICD	Implantierbarer Cardioverter/ Defibrillator
IFN	Interferon
IgE	Immunglobulin E
IgM	Immunglobulin M
IL	Interleukin
IP ₃	Inositol-(1,4,5)-Trisphosphat
ISFC	International Society and Federation of Cardiology
JAK	Januskinase
Kb	Kilobase
KDa	Kilo-Dalton
l	Liter
LV	Linksventrikulär
LVEDP	Linksventrikulärer enddiastolischer Druck
m ²	Quadratmeter
mAk	Monoklonaler Antikörper
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
mg	Milligramm
MG	Molekulargewicht
MHC	Major histocompatibility complex
min	Minute
ml	Milliliter
μl	Mikroliter
mRNA	Messenger RNA
MS	Multiple Sklerose

Msp	Moroxella Spezies
NK	Natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
NYHA	New York Heart Association
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PE	Phycoerythrin
PTP	Protein-Tyrosin-Phosphatase
RFLP	Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus
RNA	Ribonucleinsäure
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion
SCID	Severe combined immunodeficiency
sec	Sekunde
SSC	Side- Scatter
snRNA	small nuclear RNA
STAT	Signal transducer an activator of transcription
T	Thymin
Taq	Thermus aquaticus
TCR	T-Zell-Rezeptor
U	Umdrehungen
U	Uracil
UV	Ultraviolett
V	Volt
vs.	Versus
WHO	World Health Organization

INHALTSVERZEICHNIS	6
1 ZUSAMMENFASSUNG	9
2 EINLEITUNG	
2.1 DILATATIVE KARDIOMYOPATHIE.....	10
2.1.1 SYSTEMATIK DER KADRIOMYOPATHIEN.....	10
2.1.2 EPDIEMIOLOGIE, SYMPTOMATIK UND DIAGNOSTIK DER DCM.....	11
2.1.3 THERAPIE DER DCM.....	14
2.2 CD45	15
2.2.1 STRUKTUR DES CD45 MOLEKÜLSYSTEMS.....	15
2.2.2 BEDEUTUNG DER INTRAZELLULÄREN PHOSPHATASEAKTIVITÄT.....	16
2.2.3 MERKMALE DES EXTRAZELLULÄREN BEREICHES.....	17
2.2.4 CD45-EXPRESSIONSMUSTER BEI WILDTYP-T-ZELLEN.....	20
2.2.5 CD45-EXPRESSIONSMUSTER BEI T-LYMPHOZYTEN MIT VARIANTEM PHÄNOTYP.....	22
3 ZIELSETZUNG	25
4 MATERIAL	26
4.1 PATIENTEN	26
4.2 CHEMIKALIEN	26
4.3 VERBRAUCHSMATERIALIEN	27
4.4 GERÄTE	28
4.5 ANTIKÖRPER	29
4.6 ANTIKÖRPER ZUR ISOTYPENKONTROLLE.....	30
4.7 PRIMER.....	30
4.8 ANSÄTZE.....	31
5 METHODEN	32
5.1 DURCHFLUSSZYTOMETRIE	32
5.2 FÄRBEANSATZ FÜR CD45	33
5.3 FÄRBEANSATZ ZUR ISOTYPENKONTROLLE.....	34
5.4 ISOLIERUNG VON DNA AUS VOLLBLUT.....	35
5.5 PHOTOMETRIE.....	36

5.6	PCR-REAKTION.....	36
5.7	AUSFÄLLEN DER DNA- AMPLIFIKATE	39
5.8	ANSATZ DER RFLP-ANALYSE FÜR DIE GENOTYPENDIAGNOSTIK	39
5.9	GELELEKTROPHORESE	40
5.10	FOTOGRAFIE	40
5.11	STATISTIK	41
6	ERGEBNISSE	42
6.1	IDENTIFIZIERUNG DER LYMPHOZYTENPOPULATIONEN IM DURCHFLUSSZYTOMETER	42
6.2	VERDÜNNUNGSREIHEN	44
6.3	ISOTYPENKONTROLLE	46
6.4	ANALYSE VON LYMPHOZYTENPOPULATIONEN MIT CD45RA/CD45R0 – DOPPELFLUORESCENZANALYSEN	47
6.5	NACHWEIS DER PUNKTMUTATION IM EXON A DES CD45 GENS DURCH RFLP-ANALYSE	49
6.6	BESTIMMUNG DER ALLELFREQUENZ	54
7	DISKUSSION	55
7.1	UNTERSCHIEDLICHE EXPRESSIONSMUSTER DER CD45 ISOFORMEN	55
7.2	ALTERNATIVE SPLEISSVORGÄNGE BEI CD45	56
7.3	HOMOZYGOTIE	60
7.4	ASSOZIATION DER VARIANTEN CD45RA-EXPRESSION AUF T-LYMPHOZYTEN MIT VERSCHIEDENEN KRANKHEITSBILDERN	65
7.5	DIE DCM – EIN MULTIFAKTORIELLES KRANKHEITSBILD	67
7.5.1	ASSOZIATION DER VARIANTEN CD45RA-EXPRESSION AUF T-LYMPHOZYTEN MIT DEM KRANKHEITSBILD DER IDIOPATHISCHEN DCM	70
8	LITERATURVERZEICHNIS	73
9	ANHANG	88
9.1	DANKSAGUNGEN	88
9.2	LEBENS LAUF	89
9.3	VERÖFFENTLICHUNGEN	90

EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG 91

1. Zusammenfassung

Ziel der Arbeit: Bei dem Krankheitsbild der idiopathischen dilatativen Kardiomyopathie (iDCM) werden autoimmunologische Faktoren in der Krankheitsentwicklung diskutiert. In der vorliegenden Arbeit wurde mittels molekularbiologischer Methoden überprüft, ob ein Zusammenhang zwischen einem C77G- Polymorphismus im Exon A des CD45Gens, mit resultierender varianter CD45RA- Expression auf T-Lymphozyten, und der Entstehung der dilatativen Kardiomyopathie besteht.

Methodik: Untersucht wurde das EDTA-Blut von insgesamt 414 Personen, 104 Patienten, die wegen einer idiopathischen dilatativen Kardiomyopathie mit resultierender Herzinsuffizienz NYHA II-IV in der Klinik II des Universitätsklinikums Jena behandelt wurden; sowie 310 gesunde Probanden, deren Blut durch das Institut für Transfusionsmedizin der Universitätsklinik Jena zur Verfügung gestellt wurde. Mittels Durchflusszytometrie wurde die CD45RA- Expression auf Lymphozyten ermittelt. Durch Einsatz der PCR mit anschließender RFLP- Analyse wurde bei Individuen mit varianten CD45RA- Expressionsmuster die C77G- Transversion im Exon A des CD45 Gens nachgewiesen.

Ergebnisse: Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 13 Individuen mit einer varianten CD45RA- Expression ermittelt. Dabei handelte es sich um 5 Patienten und 8 Personen aus dem gesunden Kontrollkollektiv. Alle identifizierten Individuen wiesen einen heterozygoten C77G- Polymorphismus im Exon A des CD45 Gens auf. Homozygote Merkmalsträger fanden sich nicht. Die Allelfrequenz von 77G betrug in der Patientengruppe 2,4% und unterschied sich damit nicht signifikant von der in der Kontrollgruppe ermittelten Allelfrequenz von 1,3% ($p=0,327$).

Schlussfolgerung: Die vorliegende Studie konnte eine signifikante Assoziation zwischen dem CD45 C77G- Polymorphismus und der Entstehung einer idiopathischen dilatativen Kardiomyopathie nicht belegen. Da jedoch diese Mutation leicht gehäuft in dem Patientenkollektiv auftrat, bleibt zu diskutieren, ob das CD45 Gen als „modifier“-Gen an der Entstehung autoimmunologisch vermittelter Erkrankungen beteiligt ist.

2. Einleitung

2.1 Dilatative Kardiomyopathie

2.1.1 Systematik der Kardiomyopathien

In der ursprünglichen Klassifikation der WHO / ISFC Task Force von 1980 wurden die Kardiomyopathien als Herzmuskelerkrankungen unklarer Genese definiert und von spezifischen Herzmuskelerkrankungen bekannter Ursache abgegrenzt. Nach Inkrafttreten der neuen WHO / ISFC-Klassifikation wurde der Begriff der Kardiomyopathie erweitert (Report of the 1995 World Health Organization). Heute werden als Kardiomyopathien Herzmuskelerkrankungen bezeichnet, die durch eine kardiale Funktionsstörung charakterisiert sind. Entsprechend hämodynamischer Parameter werden dabei dilatative (Dilatation des linken und / oder rechten Ventrikels mit begleitender schwerer Einschränkung der Pumpfunktion), restriktive (interstitielle, fleckförmig verteilte Endomyokardfibrose mit diastolischer Compliancestörung), hypertrophe (linksventrikuläre Hypertrophie mit Einschränkung der diastolischen Herzfunktion), arrhythmogene rechtsventrikuläre (segmentale bis globale Kontraktionsstörung des rechten Ventrikels) und unklassifizierbare Kardiomyopathien (mitochondriale Kardiomyopathie, Fibroelastose, minimale Kardiomyopathie) unterschieden. Zu der Gruppe der spezifischen Kardiomyopathien werden diejenigen Herzerkrankungen gezählt, bei denen Ätiologie und Pathogenese bekannt sind. Sie zeigen sich meist unter dem Bild einer dilatativen Kardiomyopathie. Die ischämische Kardiomyopathie zeichnet sich durch eine kardiale Dysfunktion des nichtischämischen oder des nicht direkt infarktgeschädigten Myokards aus. Die Störung der Herzfunktion lässt sich somit nicht durch die koronare Herzerkrankung erklären. Die Ursache liegt in einem Remodelierungs-Prozess mit einer Hypertrophie der Kardiomyozyten und der Ausbildung von vermehrtem interstitiellem Bindegewebe und einer perivaskulären Fibrose. Bei der valvulären Kardiomyopathie überschreitet die kardiale Dysfunktion das Maß, welches man bei einem reinen Klappenfehler erwarten würde. Die hypertensive Kardiomyopathie bewirkt eine Hypertrophie des linken Ventrikels, eine vermehrte interstitielle Fibrose und Verbreiterung der intramuralen Gefäße. Daraus resultieren im Verlauf der Erkrankung eine diastolische und später auch eine systolische Funktionsstörung. Arznei- und Genussmittel (z.B. Alkohol,

trizyklische Antidepressiva, Lithiumcarbonat und Adriamycin) können eine medikamentös-toxische Kardiomyopathie verursachen. Zu den metabolischen Kardiomyopathien gehören jene bei endokrinen Erkrankungen (z.B. der Thyreotoxikose, dem Phäochromozytom, der Akromegalie und der Amyloidose). Die inflammatorische Kardiomyopathie wurde 1995 erstmals in die Klassifikation aufgenommen. Sie ist als akute oder chronische Entzündung des Myokards mit kardialer Dysfunktion, die histologisch und immunhistochemisch am Gewebe diagnostiziert wird, definiert. Ursächlich für diese Form sind überwiegend Virusinfektionen (Hepatitis C-Viren 15%, Adenoviren 12.5-22.5%, Cytomegalieviren 5%, Epstein-Barr-Viren 2.5%, Maisch, 2000). Im Rahmen von Endomyokardbiopsien wird das virale Genom durch In-Situ-Hybridisierungsverfahren und RT-PCR nachgewiesen. Des Weiteren spielen auch Protozoen wie *Trypanosoma cruzi* (Chagas-Myokarditis) oder Spirochäten wie *Borrelia burgdorferi* und verschiedene autoimmunologische Prozesse eine pathogenetische Rolle.

Kardiomyopathien treten auch im Rahmen von Systemerkrankungen (Kollagenosen) auf und finden sich bei muskulären Dystrophien (Duchenne, Becker) sowie den neuromuskulären Erkrankungen (Friedreich'sche Ataxie).

2.1.2 Epidemiologie, Symptomatik und Diagnostik der DCM

Die dilatative Kardiomyopathie (DCM) ist durch eine Dilatation und überwiegend systolische links- oder biventrikuläre Kontraktilitätsstörung gekennzeichnet. In bis zu 30% werden familiär-genetische Zusammenhänge mit der Entstehung der DCM angenommen. Die eigentliche Pathogenese dieser Erkrankung ist oft unklar. Autoimmune und genetische Faktoren werden als Ursache für die Ausbildung einer idiopathischen DCM diskutiert.

Die Inzidenz der DCM beträgt 6 pro 100 000 Einwohner, die Prävalenz 36 pro 100 000 Einwohner (Kasper, 1994). Es erkranken bevorzugt Männer mit einem Manifestationsalter von 20 bis 50 Jahren. Bei bis zu 30% der Erkrankten finden sich familiäre Häufungen (Keller und Carrier, 2002). Bekannt sind autosomal-dominante, X-chromosomale (Mestroni, 1999), und autosomal-rezessive Möglichkeiten der Vererbung.

Die Prognose der Erkrankung ist schlecht. Oft entwickelt sich eine progrediente Symptomatik mit Zeichen der Herzinsuffizienz bis zum Pumpversagen und/oder bedrohlichen Arrhythmien, die zum plötzlichen Herztod führen können. Die 5-Jahres-Mortalitätsrate beträgt bis zu 50%. Klinische Symptome entwickeln sich oftmals nur langsam. Bei einigen Patienten liegen trotz

deutlich dilatierten linken Ventrikels keine Symptome vor. Dennoch kann es bei zunehmender Progression der Erkrankung sehr schnell zur Ausbildung von Symptomen und bei weiterem Fortschreiten zu einem letalen Ausgang kommen. Die Symptomatik der Patienten mit einer DCM resultiert aus dem Unvermögen des Herzmuskels, die in Ruhe und / oder bei Belastung benötigte Blutmenge zu fördern oder deren Rückfluss aufzunehmen. Dabei variiert der Grad der Funktionsstörung, sodass sowohl asymptomatische, als auch Patienten mit schwersten Beeinträchtigungen beobachtet werden. Initialsymptom ist meist Luftnot als Ausdruck einer führenden Linksherzinsuffizienz, die bis zum ausgeprägten Lungenödem führen kann. Im fortgeschrittenen Stadium der biventrikulären Beteiligung kommt es zu Zeichen der Rechtsherzinsuffizienz mit Beinödemen bis zur Anasarka, Hepatomegalie und Aszites. Pektanginöse Beschwerden, Arrhythmien und abdominelle Schmerzen bei Leberstauung sind häufig. Durch die mangelnde Perfusion der Skelettmuskulatur kommt es schnell zu einer allgemeinen Ermüdung und zunehmenden Leistungsintoleranz. Bei mangelhafter zerebraler Durchblutung treten Schwindel und Synkopen auf. Bei der klinischen Untersuchung bestehen meist ein 3. und 4. Herzton und häufig finden sich eine Mitral- und Trikuspidalinsuffizienz. Die manchmal schwere Mitralinsuffizienz kommt durch eine Dilatation des Mitralanulus zustande. Je nach Schweregrad der Herzinsuffizienz bestehen zudem Zeichen der peripheren Minderdurchblutung mit kühler Haut und peripherer Zyanose.

Sowohl Anamnese als auch klinische Untersuchungsbefunde zeigen eine geringe Sensitivität und Spezifität. Asymptomatische Patienten können starke Einschränkungen der Pumpfunktion aufweisen (geringe Sensitivität). Andererseits können die genannten Symptome anderer Genese sein und auch bei normaler kardialer Funktion auftreten (geringe Spezifität). Hämodynamisch ist die DCM durch erhöhte Füllungsdrücke bei links- oder biventrikulärer Dilatation und vermehrte endsystolische und enddiastolische Volumina gekennzeichnet. Charakteristisch ist eine Einschränkung der systolischen Pumpfunktion (EF vermindert, HZV verringert) und meist auch der diastolischen Funktion (LVEDP erhöht, LV-Füllungsdrücke erhöht).

Der Stadien der Herzinsuffizienz werden entsprechend der NYHA-Klassifikation eingeteilt (Tab.2.1):

Tab.2.1: Stadieneinteilung der Herzinsuffizienz (NYHA-Klassifikation)

- I: normale körperliche Belastungsfähigkeit ohne Beschwerden
- II: Beschwerden bei stärkerer Belastung
- III: Beschwerden bei geringerer Belastung
- IV: Beschwerden in Ruhe

Die Diagnostik der DCM umfasst nach Anamneseerhebung und körperlicher Untersuchung Laboruntersuchungen, EKG, Röntgen des Thorax, Echokardiographie, eventuell nuklearmedizinische Methoden (Antimyosinantikörperszintigraphie), sowie invasive Untersuchungen. Mit Hilfe der Echokardiographie können die Durchmesser der Herzhöhlen, Verkürzungs- und Ejektionsfraktionen bestimmt, Informationen zur diastolischen Funktion des linken Ventrikels gewonnen, sowie Klappeninsuffizienzen und andere Komplikationen wie Ergüsse oder intrakavitäre Thromben erfasst werden. Bei der invasiven Diagnostik der DCM (Rechtsherzkatheter, Linksherzkatheter) muss eine koronare Herzerkrankung ausgeschlossen und die Druck- und Widerstandswerte im kleinen und großen Kreislauf sowie Volumina bestimmt werden. Zur differentialdiagnostischen Abgrenzung gegenüber der Myokarditis und immunhistochemischen Diagnostik der Ätiopathogenese ist eine Myokardbiopsie erforderlich. Histomorphologisch zeigen sich dabei entzündliche Infiltrate mit oder ohne Myozytennekrosen sowie mit oder ohne Fibrose. Im Rahmen einer Herzkatheteruntersuchung kann die Biopsie des rechtsventrikulären Myokards zum Nachweis oder Ausschluss einer Myokarditis vorgenommen werden. Oft werden nur unspezifische Veränderungen nachgewiesen. Im Frühstadium zeigen die Myokardiozyten Zeichen der Hypertrophie, später wird eine vermehrte Degeneration der Herzmuskelzellen und interstitielle Fibrose beobachtet. Im Endstadium liegt eine deutliche Abnahme der kontraktilen Elemente vor, was eine Gefügedilatation des gesamten Herzmuskels zur Folge hat. Zelluläre Infiltrate sind in diesem Stadium oft nicht mehr vorhanden. Die Mitochondrien der Myokardzellen sind häufig geschwollen und zeigen einen Verlust an Cristae. Im Rahmen von biochemischen Analysen wurde eine Abnahme des myofibrillären Proteingehalts sowie des myofibrillären ATPs nachgewiesen. Die Abnahme dieser Parameter korreliert mit dem

Schweregrad der Erkrankung. Der Wert der Biopsie für die Erkennung der Ätiologie ist momentan jedoch noch nicht hinreichend geklärt. Bei der idiopathischen DCM sind sowohl ein chronisch mehr oder weniger stabiler Verlauf, als auch eine rasch progrediente Verschlechterung bekannt. Man schätzt eine Mortalität von 30% im ersten Jahr und eine von ca. 45% innerhalb von 2 Jahren. Als prognostisch ungünstige Faktoren gelten bei der primären DCM ein Herz-Thorax-Quotient von mehr als 0,55; ein Herzindex von weniger als $2,5 \text{ l/min/m}^2$ und ein deutlich vergrößertes linksventrikuläres diastolisches Volumen.

2.1.3 Therapie der DCM

Die Behandlung der DCM erfolgt zunächst symptomatisch. Oft ist durch körperliche Schonung bei Kochsalz- und Flüssigkeitsrestriktion eine klinische Besserung zu erreichen. Die medikamentöse Behandlung erfolgt entsprechend der Leitlinien zur Therapie der Herzinsuffizienz. ACE-Hemmer bzw. AT I-Rezeptorantagonisten gelten derzeit als Basistherapie (alle NYHA- Stadien), ggf. werden alternativ bei Unverträglichkeiten andere Vasodilantien (Nitrate, Alphablocker und vasselektive Kalziumantagonisten) angewandt. Ab NYHA II werden Diuretika und Betablocker, ab NYHA III Aldosteron-Antagonisten und Herzglykoside verabreicht (Lohr / Keppler, 1999). Besonders die konsequente Therapie mit ACE-Hemmern und Betarezeptorenblockern führte in den vergangenen Jahren zu einer deutlichen Reduktion der Mortalität (CONSENSUS I-Studie, COPERNICUS-Studie).

Zur Prävention des plötzlichen Herztodes bei DCM besteht bei symptomatischer Kammertachykardie oder Kammerflimmern mit Reanimation, nach entsprechenden elektrophysiologischen Untersuchungen die Möglichkeit, Defibrillatoren (ICD) zu implantieren. Die chirurgischen Alternativen wie Herztransplantation, Implantation von Assist-Systemen, dynamische Kardiomyoplastie und Ventrikelreduktionsplastik sind mit Risiken verbunden und z.T. nur befristet anwendbar. Bei progredienter Pumpinsuffizienz und geplanter Herztransplantation ist zusätzlich der Mangel an Spenderorganen zu berücksichtigen.

Grundlage einer kausalen Therapie der DCM stellt das pathophysiologische Konzept über eine Assoziation zwischen einer Virusinfektion und einer autoreaktiven Kardiomyopathie dar.

Trotz Fortschritten der konventionellen Therapie der DCM ist die Prognose auch heute noch ernst, so dass in den letzten Jahren alternative Behandlungsverfahren gesucht wurden. Neben den konservativ-medikamentösen Therapiemöglichkeiten bilden die Verlaufsformen Ansätze für

immunmodulatorische Behandlungsmethoden. Als neuer Therapieansatz werden durch die Immunadsorption (IA) die Autoantikörper gegen myokardiale Strukturen, die bei den Patienten mit DCM nachweisbar sind, entfernt. Es wird davon ausgegangen, dass unter anderem die Eliminierung der Autoantikörper die kardiodepressive Wirkung aufhebt und auf diesem Weg eine Verbesserung der Pumpfunktion zu erreichen ist.

2.2 CD45

2.2.1 Struktur des CD45 Molekülsystems

Im vorherigen Kapitel wurde dargelegt, dass immunologische Komponenten für die Pathologie der DCM von Bedeutung sein können. Ein wesentliches Schlüsselmolekül des Immunsystems ist CD45. Dieses aus 1100-1300 Aminosäuren bestehende transmembranöse Glykoprotein wird von sämtlichen Leukozyten und ihren Vorläuferzellen exprimiert. Es besteht aus einer extrazellulären, einer transmembranösen und einer intrazellulären Domäne (Abb. 2.1). Die extrazelluläre Domäne ist variabel gestaltet, wodurch das CD45 Molekül in verschiedenen Isoformen auftritt. Durch die transmembranöse Domäne wird das Molekül in der Zellmembran verankert. In der intrazellulären Domäne ist Phosphataseaktivität lokalisiert, die dem Molekül essentielle funktionelle Eigenschaften in der T- und B-Zellsignaltransduktion verleiht. Das Gen für CD45 liegt auf Chromosom I (Ralph et al., 1987), hat eine Größe von 130 kb (Fernandez-Luna et al., 1991) und besteht aus 33 Exons (Hall et al., 1988). Die intrazelluläre Region besteht aus etwa 700 Aminosäuren, die zwei Domänen bilden. Enzymatische Aktivität in Form von Phosphataseaktivität ist in der membranproximalen Domäne lokalisiert (Fisher et al., 1991). Die membrandistale intrazelluläre Domäne besitzt keine Phosphataseaktivität (Streuli et al., 1990), eine mögliche Beteiligung dieser Domäne an der Regulation der Phosphataseaktivität der membranproximalen Domäne wird jedoch diskutiert. Auf die Bedeutung der intrazellulären Phosphatasen, sowie die spezifischen Merkmale der extrazellulären Domäne wird in den nächsten Kapiteln näher eingegangen.

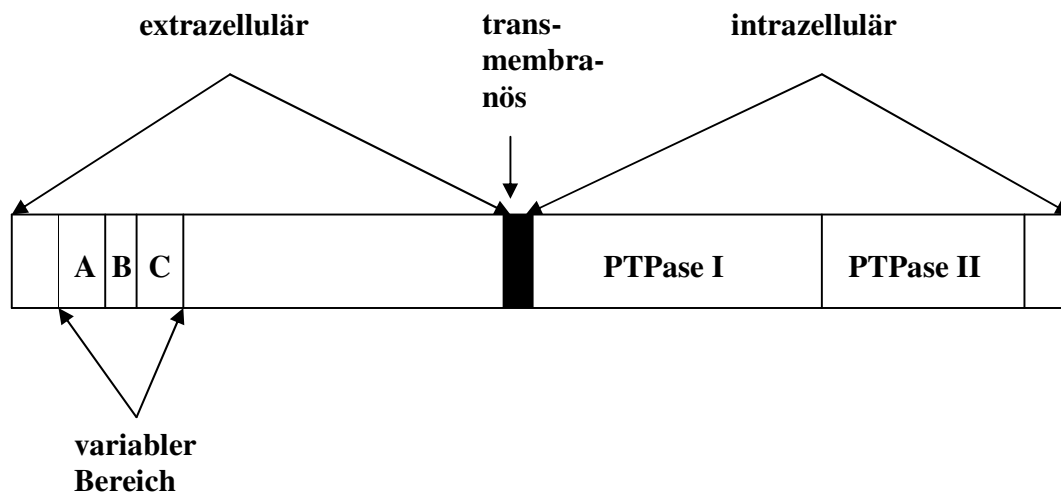


Abb. 2.1: Struktur des CD45 Moleküls

Das CD45 Molekül besteht aus einem extrazellulären, einem transmembranösen und einem intrazellulären Bereich mit zwei Protein-Tyrosin-Phosphatasedomänen (PTPase 1 und PTPase 2). A, B, und C bezeichnen Aminosäurebereiche, die durch die variabel verwendeten Exons A, B und C kodiert werden.

2.2.2 Bedeutung der intrazellulären Phosphataseaktivität

Das CD45 Molekül hat durch seine intrazelluläre Phosphataseaktivität eine große Bedeutung für verschiedene immunologische Signaltransduktionsprozesse. Beim Menschen wurde dieses Merkmal an CD45-defizienten Patienten sichtbar. Diese Patienten litten an schweren Immundefizienzen (SCID) (Cale et al., 1997; Kung et al., 2000; Tchilian et al., 2001). Weitere ausgiebige Experimente zur Bedeutung des CD45 Moleküls wurden an CD45 knock-out Mäusen durchgeführt. Bei CD45-defizienten Mäusen wurden Entwicklungsstörungen des Thymus mit vermehrten Apoptosen und fehlerhafter Signalübertragung durch den T-Zellrezeptor (TCR) nachgewiesen. Dadurch ist die absolute Anzahl der Thymozyten vermindert. Periphere CD45-negative T-Zellen reagieren vermindert auf eine Antigenstimulation. Bei ihnen kommt es nach Stimulation des TCR weder zur Zytokinproduktion, noch zur Proliferation oder Zytolyse (Fukuhara et al., 2002; Wallace et al., 1997). Es konnte gezeigt werden, dass bei CD45 negativen T-Zellen sowohl der Ca^{2+} - als auch der IP_3 -Anstieg fehlen, die sonst bei Aktivierung über den

TCR auftreten (Koretzky et al., 1990; Koretzky et al., 1992). Außerdem fehlen Tyrosinphosphorylierungen, die initial nach einer T- Zellaktivierung auftreten und vor allem durch die Proteinkinasen p56^{lck} und p59^{fyn} vermittelt werden (Hermiston, 2003). Diese Proteinkinasen sind ein primäres Substrat für CD45 und verantwortlich für die Initialisierung der Immunantwort in T- und B-Zellen.

Bei der Signalübertragung von B-Zellen sind Lyn und Fyn wichtige Proteinkinasen, wobei vor allem die Lyn-Kinase als positiver und negativer Regulator der B-Zellrezeptorsignaltransduktion eine Rolle spielt. Sie phosphoryliert sowohl aktivierende, als auch inhibierende Bereiche des B-Zellrezeptors (BCR) und ändert so dessen Funktionszustand.

CD45 dephosphoryliert Lyn und aktiviert so die Proteinkinase. CD45 negative B-Zellen weisen eine gestörte Signaltransduktionskette auf. Werden sie über den IgM-Rezeptor stimuliert, führt dieses nicht zur Dephosphorylierung signaltransduktionsrelevanter Proteine wie Lyn und Fyn. Vor allem bei unreifen B-Zellen wird CD45 als negativer Regulator der B-Zell-Rezeptortransduktionskette betrachtet.

Die Bedeutung von CD45 in der Signaltransduktion von NK-Zellen ist noch nicht vollständig geklärt. Verschiedene Studien zeigten, dass bei einer lytisch aktiven NK-Zelle der Verlust von CD45 mit einem Verlust der Zellaktivität assoziiert ist.

Bei Mastzellen ist CD45 besonders für die IgE-vermittelte Histaminfreisetzung von Bedeutung (Hermiston, 2003).

2.2.3 Merkmale des extrazellulären Bereiches

Die extrazelluläre Domäne der CD45 Moleküle wird abhängig von Zellart, Entwicklungsstadium und Aktivitätszustand der Leukozyten in unterschiedlichen Isoformen exprimiert (Virts et al., 1997). Diese Variabilität wird durch alternatives Spleißen der CD45-mRNA bedingt. Alternativ gespleißt werden die für den aminoterminalen Bereich kodierenden Exons 4 (A), 5 (B) und 6 (C). Zwischen diesen Exons liegen Intronbereiche mit einer Größe von 0,9 kb bis 4,8 kb. An den Spleißstellen wurden charakteristische Konsensussequenzen nachgewiesen (GT an der 5'-Spleißstelle, AG an der 3'-Spleißstelle). Diese Sequenzen sind für das Entfernen von Introns (konstitutive Spleißreaktion) und Exons (alternative Spleißreaktion) notwendig. Beim alternativen Spleißen wird eine 5'-Spleißstelle mit unterschiedlichen 3'-Spleißstellen kombiniert. Daraus resultieren verschiedene Transkripte, die für unterschiedliche Isoformen eines Proteins

kodieren. Abhängig von den benutzten variablen Exons werden beim Menschen fünf Isoformen des CD45-Moleküls unterschieden und als ABC, AB, BC, B und 0 (kein variabel verwendetes Exon) bezeichnet. Die theoretisch denkbaren Isoformen A, AC und C konnten bislang beim Menschen nicht nachgewiesen werden.

In Abbildung 2.2 ist das CD45 Gen und die Bildung verschiedener Isoformen durch alternative Spleißprozesse dargestellt.

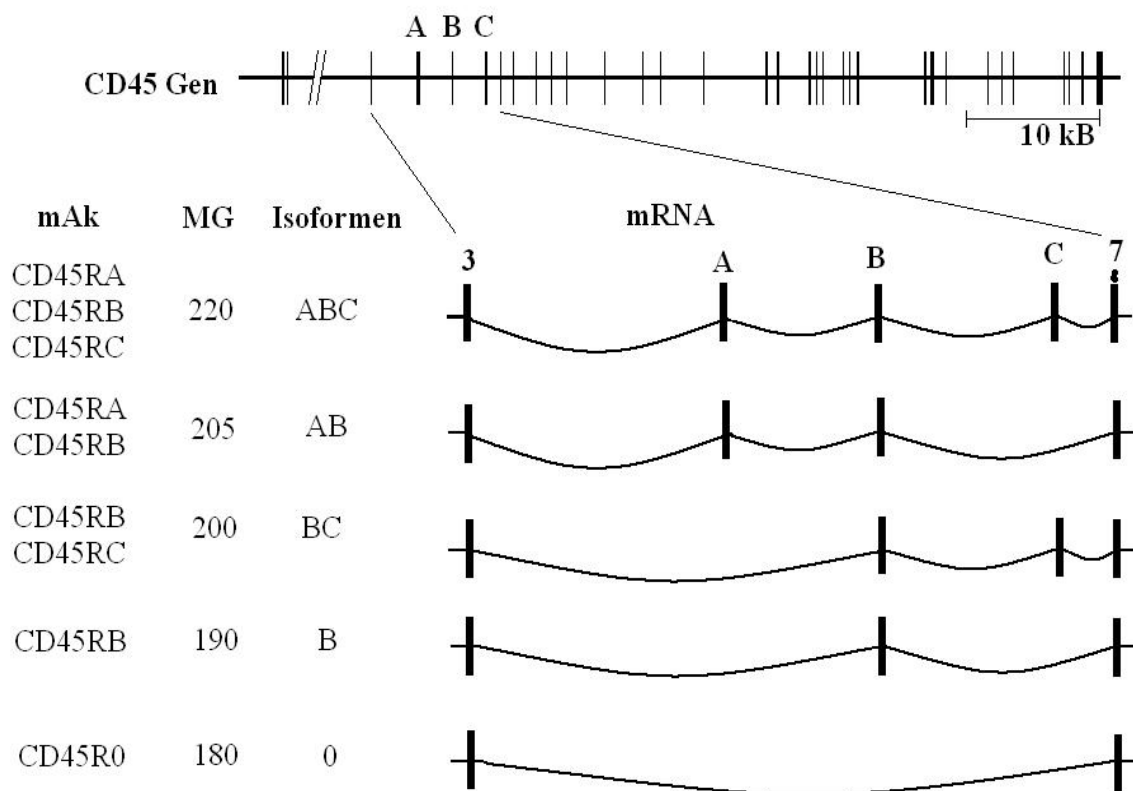


Abb. 2.2: Schematische Darstellung des Gens für CD45 und der, durch alternatives Spleißen entstandenen unterschiedlichen Isoformen des CD45-Moleküls

Im oberen Bereich des Bildes ist das Gen für CD45 dargestellt. Jedes Exon wurde durch einen Strich markiert und die variabel verwendeten Exons entsprechend gekennzeichnet. Der untere Teil des Bildes gibt schematisch die aus alternativen Spleißprozeß resultierenden mRNA-Spezies wieder, die für 5 differente humane CD45-Isoformen (ABC, AB, BC, B und 0) kodieren können. Des Weiteren sind entsprechende Molekulargewichte (MG) und reagierende monoklonalen AK aufgeführt.

Besonders häufig kodieren die variabel verwendeten Exons A, B und C für die Aminosäuren Serin und Threonin, die O-glykosyliert werden können. Potentielle N-Glykosylierungsstellen werden durch Exon A dreimal, durch Exon B zweimal und durch Exon C einmal kodiert, so dass gleiche Isoformen unterschiedlich glykosyliert sein können (Trowbridge und Thomas 1994). Als Ligand für die Isoform CD45R0 wird ein Oberflächenlektin diskutiert, das eine ubiquitär vorkommende α 2,6-sialinhaltige Zuckerstruktur erkennt, die auch auf dem CD45R0 Molekül vorhanden ist. Es ist wahrscheinlich, dass die Bindung natürlich vorkommender Liganden an die extrazelluläre Domäne von CD45 regulative Auswirkungen auf die intrazelluläre Phosphataseaktivität hat. Verschiedene Studien an EGFR-CD45 Fusionsproteinen zeigten, dass durch die Bindung von EGF an das EGFR-CD45 Fusionsprotein die Phosphataseaktivität negativ reguliert wird (Desai et al., 1993). Bei in vitro Stimulationsexperimenten modulieren mehrere CD45-mAK die Fähigkeit zur Lymphozytenantwort sowohl positiv, als auch negativ, so dass auch in vivo die extrazelluläre Domäne durch die Interaktion mit einem natürlichen Liganden regulative Funktionen übernehmen könnte. Diese natürlichen Liganden konnten bisher allerdings noch nicht näher charakterisiert werden.

Monoklonale Antikörper gegen Moleküle der CD45 Familie erkennen Epitope in unterschiedlichen Molekülbereichen. Dabei werden Epitope unterschieden, die in nicht-variablen Bereichen des Moleküls liegen und „common epitopes“ bilden (CD45Com) und Epitope, die von den variabel exprimierten Exons kodiert werden. Diese Epitope kommen jeweils nur auf einem Teil der Isoformen vor und werden daher als CD45R-Epitope bezeichnet (R für restricted). Eine Reihe von Isoformen benutzen mehrere der variabel exprimierten Exons und können deshalb mehrere verschiedene CD45R Epitope besitzen. Eine Ausnahme stellen CD45R0-mAk dar, weil die R0 spezifischen Epitope auf die Isoform 0 beschränkt sind.

In Tabelle 2.2 wird der Zusammenhang zwischen Isoformstruktur und Reaktivität mit den verschiedenen bekannten Antikörperspezifitäten aufgezeigt. Mit Ausnahme des CD45R0 Antikörpers reagieren alle exonspezifischen Antikörper mit mehr als einer Isoform. Dadurch wird die Analyse der spezifischen Isoformexpression mit monoklonalen Antikörpern auf Einzelzellen wesentlich erschwert.

Tabelle 2.2 Relative Molekülmasse und serologische Epitopstruktur der beim Menschen nachgewiesenen CD45-Isoform

Molekulargewicht in kD	Isoform	<u>Reaktivitäten*) verschiedener CD45-mAK</u>				
		RA	RB	RC	R0	Com
220	ABC	+	+	+	-	+
205	AB	+	+	-	-	+
200	BC	-	+	+	-	+
190	B	-	+	-	-	+
180	0	-	-	-	+	+

*) + bedeutet Reaktivität, - fehlende Reaktivität

Während der Nachweis einzelner serologischer Epitope vor allem durch durchflußzytometrische Messungen erfolgt, werden definierte Isoformen per Immunpräzipitation nachgewiesen. Durch eine Kombination beider Verfahren in Verbindung mit monoklonalen Antikörpern verschiedener Spezifität konnte auf Proteinebene gezeigt werden, dass die einzelnen Isoformen in komplexen Mustern exprimiert werden, die sich in Abhängigkeit vom jeweiligen Aktivierungs- und Differenzierungszustand des Leukozyten ändern. Ergänzend zu den Analysen auf Proteinebene, wurden RT-PCR-Analysen durchgeführt, die bestätigten, dass die verschiedenen CD45 Isoformtranskripte in Abhängigkeit vom Differenzierungs- und Aktivierungszustand auftraten. Besonders ausgeprägt ist diese Eigenschaft des CD45 Molekülsystems bei T-Zellen und Thymozyten (Wallace und Beverly, 1990).

2.2.4 CD45-Expressionsmuster bei Wildtyp-T-Zellen

Thymozyten durchlaufen im Thymus eine positive und negative Selektion. Reife Thymozyten werden in die Peripherie entlassen und repräsentieren dann naive T-Zellen(CD45RA+/CD45R0-), die noch keinen Antigenkontakt gehabt haben, während bei präaktivierten und memory T-Zellen mit CD45RA-/CD45R0+ ein umgekehrtes Expressionsmuster auftritt (Akbar et al., 1988). Außerdem besitzen diese T-Zellsubpopulationen unterschiedliche funktionelle Eigenschaften.

So synthetisieren z.B. CD45RA-/CD45R0+ T-Zellen nach Stimulation ein breites Spektrum an Cytokinen, während CD45RA+/CD45R0- T-Zellen nach Stimulation hauptsächlich IL-2, jedoch kein IFN γ oder IL-4 produzieren (Colon et al., 1995).

Abbildung 2.3 zeigt die unterschiedlichen CD45-Expressionsmuster bei Wildtyp-T-Zellen, die durch RT-PCR Analysen ermittelt werden konnten.

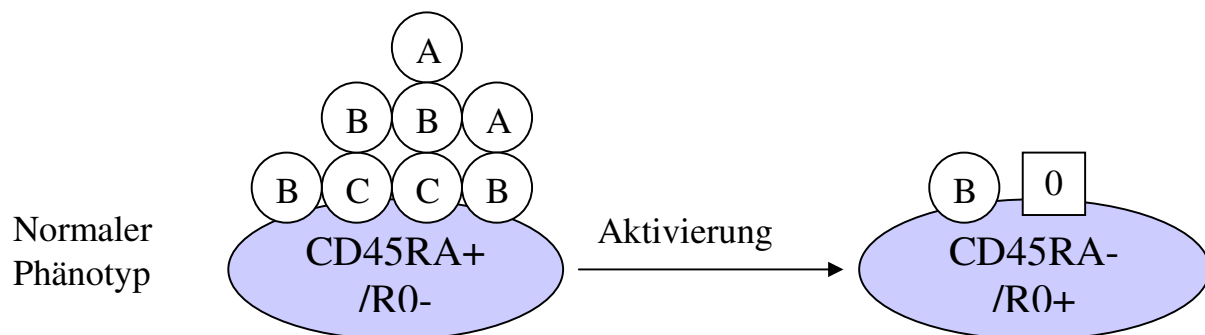


Abb. 2.3: Unterschiedliche Isoformen von CD45 bei T-Zellen mit normalem Phänotyp (Wildtyp)

Während naive T-Zellen die Isoformen B, BC, AC und AB exprimieren, werden nach Aktivierung überwiegend die Isoformen B und 0 exprimiert.

CD45RA+/CD45R0-T-Zellen exprimieren die Isoformen ABC, AB, BC und B, nicht aber die Isoform 0 (Rogers et al., 1992).

Nach Aktivierung reifen und differenzieren CD45RA+/CD45R0- T-Zellen zu antigenaktivierten CD45RA-/CD45R0+ T-Zellen, die vor allem die Isoformen B und 0 exprimieren (Rogers et al., 1992). Daher bewirkt eine Aktivierung eine Veränderung in der Regulation der Spleißprozesse von CD45.

Im Zuge der Aktivierung werden spezifische Proteine, sogenannte *trans*-agierende Spleißfaktoren induziert, die das Entfernen einzelner Exons aus der unreifen RNA steuern (Rothstein et al., 1992). Für die Exons A und C des CD45-Gens wurden innerhalb des Exons und der flankierenden Introns spezifische Basensequenzen (*cis*-Elemente) identifiziert, die für den Spleißprozess essentiell sind und damit als Interaktionspunkte für *trans*-agierende Spleißfaktoren

in Betracht kommen (Tsai et al., 1989). Durch eine Wechselwirkung zwischen *trans*-agierendem Spleißfaktor und zugehörigem *cis*-Element wird der Verlust des jeweiligen Exons ausgelöst.

2.2.5 CD45-Expressionsmuster bei T-Lymphozyten mit variantem Phänotyp

Ein genetischer Polymorphismus in Exon A führt zu einem variantem CD45RA Expressionsmuster. Bei betroffenen Individuen bleiben die aktivierten T-Zellen CD45RA positiv und zeigen somit einen varianten CD45R0+/CD45RA+ Phänotyp. Dies beruht auf der persistierenden Expression der Isoform AB. In Abbildung 2.4 sind die verschiedenen CD45-Isoformen bei T-Lymphozyten mit variantem Phänotyp dargestellt.

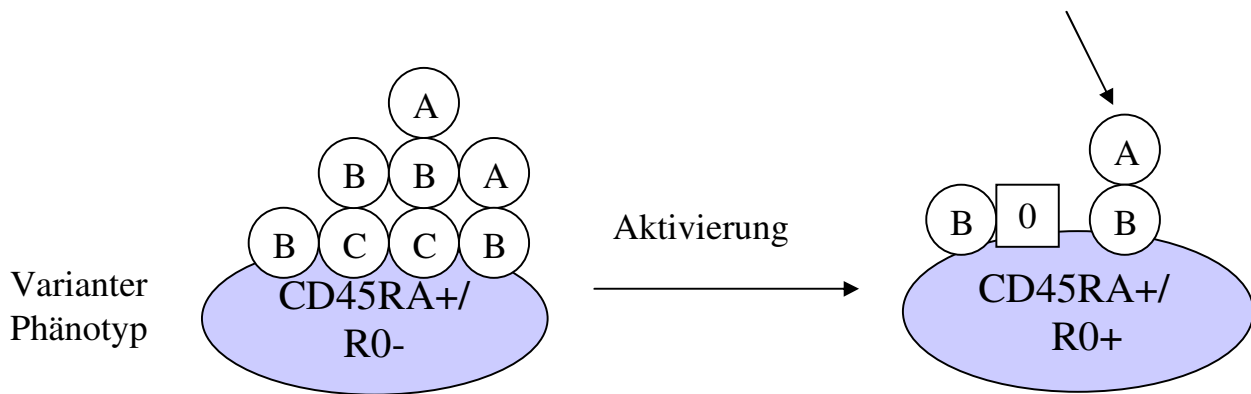


Abb. 2.4: CD45-Isoformen bei T-Lymphozyten mit variantem Phänotyp

Während das Expressionsmuster der naiven T-Zellen dem der Wildtyp-Zellen entspricht, wird bei T-Lymphozyten mit C → G Transversion in Position 77 von Exon A durch abweichende alternative Spleißprozesse weiterhin die Isoform AB auf aktivierten T-Zellen exprimiert.

Das Exon A der Isoform AB unterliegt bei den Merkmalsträgern nicht mehr dem alternativen Spleißprozess, sondern wird in ein konstitutiv exprimiertes Exon umgewandelt.

Grund dafür ist eine Punktmutation an Position 77 des Exon A, bei der ein Nukleotidaustausch von C zu G stattfindet. Da das mutierte Codon 26 mit CCG nach wie vor für die Aminosäure Prolin kodiert, handelt es sich bei der Transversion um eine neutrale Mutation, d.h. sowohl das mutierte Codon, als auch das Codon des Wildtyps kodieren für die Aminosäure Prolin.

Außerdem werden durch die Punktmutation keine weiteren Akzeptor- oder Donorspleißstellen

entwickelt. (Streuli und Saito, 1989a)

Dennoch ist die Punktmutation für den veränderten Spleißprozess verantwortlich. Die hochkonservierten Nukleotidsequenzen GT an der 5'-Spleißstelle im Intron 3 (Intron vor Exon A), sowie AG an der 3'-Spleißstelle im Intron 4 (Intron hinter Exon A), und das Sequenzmotiv TGAT mit dem Adenin-Baustein als wahrscheinlichem Verzweigungspunkt für die Spleißreaktion, bilden einen Grundsatz von *cis*-Elementen, der notwendig ist, um Exon A aus der prä-mRNA zu entfernen. Obwohl bei den untersuchten Merkmalsträgern keine Mutationen auftreten, kann Exon A aus der unreifen RNA nicht entfernt werden. Somit müssen am Spleißprozess von Exon A weitere *cis*-Elemente beteiligt sein.

Es konnte gezeigt werden, dass im Exon A weitere *cis*-Elemente liegen, die als Wechselwirkungspunkte für *trans*-agierende Spleißfaktoren, wie z.B. SC35 dienen (Wang et al., 2001). Die Interaktion zwischen diesen *cis*-Elementen und den Spleißfaktoren stellt wahrscheinlich eine weitere Voraussetzung dar, um das Exon A erfolgreich aus der prä-mRNA zu entfernen. Da die Punktmutation an Position 77 von Exon A lokalisiert ist, wird die Sequenz eines *cis*-Elementes verändert, während die anderen beiden *cis*-Elemente unverändert Wildtyp-Sequenz zeigen. Die Mutation des *cis*-Elementes stört wahrscheinlich die Interaktion mit dem zugehörigen *trans*-agierenden Spleißfaktor. Zwei unterschiedliche Mechanismen werden dafür in Betracht gezogen. Liegt die Punktmutation im Bereich eines spezifischen Sequenzmotivs, könnte dieses Sequenzmotiv durch die Punktmutation in ein niederaffines, unwirksames Sequenzmotiv umgewandelt werden. Falls die Mutation dagegen in der Umgebung des Sequenzmotivs lokalisiert ist, könnte durch die Punktmutation eine übergeordnete räumliche Struktur modifiziert werden, die eine funktionelle Bedeutung bei der Wechselwirkung zwischen *trans*-agierendem Spleißfaktor und Sequenzmotiv hat.

Alle bisher untersuchten Individuen mit der beschriebenen Punktmutation der CD45RA-Expression sind heterozygot. Das bedeutet, dass sie über ein homologes Chromosom mit dem Wildtyp verfügen. Durch das nichtmutierte Chromosom können alle Isoformen gebildet werden, wodurch das CD45-Isoform-Repertoire vollständig erhalten bleibt.

Die aktivierten T-Zellen von Merkmalsträgern exprimieren nach wie vor die Isoformen B und 0, die üblicherweise bei aktivierten T-Zellen zu finden sind. Wichtige Komponenten des für aktivierte T-Zellen typischen CD45-Expressionsmusters sind bei den Merkmalsträgern trotz Punktmutation weiterhin vorhanden. Dennoch werden nach neueren Erkenntnissen die

funktionellen Eigenschaften von aktivierten T-Zellen bei Merkmalsträgern verändert. So werden erhöhte Ausschüttungen von IL-2, IL-4 und IL-5 beschrieben.

Bisher wurde noch kein homozygoter Träger der Punktmutation gefunden. Somit ist unklar, welche funktionellen Auswirkungen der homozygote Zustand hat.

3. Zielsetzung

1999 lieferte eine Forschungsgruppe der Philipps-Universität Marburg Hinweise auf eine mögliche Assoziation zwischen der C → G Transversion an Position 77 im Exon A des CD45 Gens und der Entstehung der Multiplen Sklerose (Jacobsen et al., 2000). Dies konnte in einer weiteren Studie der Ruhr-Universität Bochum nicht bestätigt werden. Bei anderen Autoimmunerkrankungen, wie z.B. der Systemischen Sklerodermie (Schwinzer et al., 2003) oder der Autoimmunhepatitis (Vogel et al., 2003) wurden jedoch Assoziationen mit jener Punktmutation konstatiert. Da verschiedene autoimmunologische Aspekte auch für die Entwicklung einer dilatativen Kardiomyopathie diskutiert werden, soll in dieser Arbeit analysiert werden, ob diese Punktmutation im Exon A des CD45 Gens mit dem Krankheitsbild der dilatativen Kardiomyopathie assoziiert ist. Dabei standen folgende Fragen im Mittelpunkt:

- 1.) Wie oft tritt der variante CD45RA-Phänotyp in einem Patientenkollektiv mit dilatativen Kardiomyopathien im Vergleich zu einem Kontrollkollektiv von gesunden Blutspendern auf?
- 2.) Kann bei sämtlichen Individuen mit variantem CD45RA-Phänotyp die C → G Transversion an Position 77 von Exon A nachgewiesen werden und ist die zugehörige 77G Allelfrequenz im Patientenkollektiv und Kontrollkollektiv statistisch signifikant verschieden?

Die Bearbeitung dieser Fragen trägt dazu bei herauszuarbeiten, ob neben der bekannten Punktmutation an Position 77 von Exon A weitere, bisher unbekannte, Punktmutationen auftreten, die den varianten CD45RA-Phänotyp verursachen.

Darüber hinaus liefern die Ergebnisse zu diesen Fragen wertvolle Hinweise, um beurteilen zu können, ob die C77G Transversion im CD45 Gen als autoimmunologische Komponente am Pathomechanismus der dilatativen Kardiomyopathie beteiligt ist. In diesem Fall müsste die 77G Allelfrequenz im Patientenkollektiv gegenüber dem Kontrollkollektiv statistisch signifikant erhöht sein. Wenn dieser Fall zutrifft, hätte die Punktmutation an Position 77 von Exon A des CD45 Gens auch diagnostischen Wert, um sie zum Nachweis von dilatativen Kardiomyopathien mit einzusetzen.

4. Material

4.1 Patienten:

Das Krankengut bestand aus 104 Patienten, die in Jena und dem Einzugsgebiet lebten und in der Klinik II für Innere Medizin des Universitätsklinikums Jena wegen einer idiopathischen dilatativen Kardiomyopathie mit resultierender Herzinsuffizienz NYHA II-IV therapiert wurden. Es handelte sich hierbei um 82 männliche, sowie um 22 weibliche Patienten im Alter zwischen 20 und 80 Jahren (Durchschnittsalter 56 Jahre, Median 57 Jahre). Alle Patienten/innen haben freiwillig an der Studie teilgenommen, sind aufgeklärt worden und haben ihr Einverständnis durch Unterschrift dokumentiert. Das Projekt ist durch die Ethik-Kommission der Universitätsklinik Jena begutachtet worden. Hierbei wurden aus ethischer Sicht keine Bedenken geäußert, so dass für das Projekt ein positives Votum erteilt wurde (Bearbeitungs- Nr.: 1336-06/04).

Die Kontrollgruppe setzte sich aus 310 freiwilligen gesunden Blutspendern zusammen, die durch das Institut für Transfusionsmedizin der Universitätsklinik Jena zur Verfügung gestellt wurden. Darunter befanden sich 245 Männer, sowie 65 Frauen im Alter zwischen 20 und 68 Jahren (Durchschnittsalter 34 Jahre, Median 36 Jahre) .

4.2 Chemikalien:

Chemikalien

Ampli Taq® DNA- Polymerase 5 U/ µl

Ampuwa® (destilliertes Wasser)

Aqua ad iniectabilia 10 ml

Elektrophoresemarker

DNA- Längenstandard

(ø x 174 – Hae III)/ 118 bp – 1353 bp)

Elektrophorese- Puffer

Ethidiumbromid 10 mg/ ml

Firma

Applied Biosystems; Forster City, USA

Fresenius Kabi; Bad Homburg Deutschland

Braun AG; Melsungen, Deutschland

BAG, Lich, Deutschland

Apotheke der FSU; Jena, Deutschland

Sigma; Deisenhofen, Deutschland

FACS- Rinse	Becton Dickinson; San Jose, CA, USA
FACS- Flow	Becton Dickinson; San Jose, CA, USA
FACS- Safe	Becton Dickinson; San Jose, CA, USA
Gel Loading Solution 5 ml G-2526	Sigma; Deisenhofen, Deutschland
L- Puffer	Roche; Basel, Schweiz
Lysereagenz	Becton Dickinson; San Jose, CA, USA
MetaPhor®- Agarose	Biozym; Hess. Oldendorf, Deutschland
Natriumacetat- Puffer II 3 M	Apotheke der FSU; Jena, Deutschland
pH 5,16	
PBS (Phosphate Buffered Saline)	Sigma; Deisenhofen, Deutschland
PCR- Master Mix	Genovision; Philadelphia, USA
Puregene™-Testkit	Biozym; Hess. Oldendorf, Deutschland
<u>bestehend aus:</u>	
RBC- Lyse- Reagenz	
Zelllyse- Lösung	
Protein- Präzipitationslösung	
Restriktionsendonuklease Msp I	Roche; Basel, Schweiz
96% Isopropanol	Mallinckrodt Baker; Deventer, Niederlande
96% Ethanol	Apotheke der FSU; Jena, Deutschland
80% Ethanol	Apotheke der FSU; Jena, Deutschland
70% Ethanol	Mallinckrodt Baker; Deventer, Niederlande

4.3 Verbrauchsmaterial:

<u>Material</u>	<u>Firma</u>
EDTA – Monovetten	Sarstedt; Nümbrecht, Deutschland
Eppendorfhütchen	Eppendorf; Hamburg, Deutschland
Falcon®- Röhrchen 5 ml	Becton Dickinson; San Jose, CA, USA
12 x 75 mm	
Latexhandschuhe Größe M	Ansell GmbH; München, Deutschland
PCR – Softstrips 0,2 ml	Biozym; Hess. Oldendorf, Deutschland

Pipettenspitzen zur DNA – Analyse:

10 µl	Maxymum Recovery™
200 µl	Filtertip FT 200 Greiner blo-one

Pipettenspitzen zur FACS- Analyse:

10-1000 µl	Brand; Wertheim, Deutschland
------------	------------------------------

4.4 Geräte:**Geräte****Firma****Elektrophorese:****Spannungsgerät: Power Pac 3000**

Bio- Rad; München, Deutschland

Elektrophoresekammer: Sub Cell

Bio- Rad; München, Deutschland

Erlmeyer- Kolben: 500 ml VWR- Brand

Merck; Darmstadt, Deutschland

FACS- Gerät: FACSCalibur

Becton Dickinson; San Jose, CA, USA

Geldokumentationssystem N90, MW 312 nm

Konrad Benda; Wiesloch, Deutschland

Kühlschränke:**Eisfink**

Polar, Dresden, Deutschland

Medical Refrigeration MRF 280/35

Electrolux; Bochum, Deutschland

Mikrowelle

Bosch; München, Deutschland

PCR- Maschine:

Biozym; Hess. Oldendorf, Deutschland

PTC-225 Peltier Thermal Cycler**PC- System:** zugehörig zum FACS Calibur

Apple- Macintosh; Silicon Valley, USA

Pipetten: 1- 1000 µl (**Pipetman**)

Gilson; Middleton, WI, USA

Quarzküvetten QS

Pharmacia; Freiburg, Deutschland

Reaktionsgefäßständer:

Brand; Wertheim, Deutschland

Micro Test Tube Rack**RNA/ DNA Calculator Gene Quant**

Pharmacia; Freiburg, Deutschland

Thermomixer comfort

Eppendorf; Hamburg, Deutschland

Transferpette®: 0,5- 10 µl

Brand; Wertheim, Deutschland

Vortexer: Reax control	Heidolph; Schwabach, Deutschland
Waage 444-45	Kern; unbekannt
Zentrifuge: Biofuge Pico	Heraeus; Hanau, Deutschland
667- Polapan- Film	Polaroid; Offenbach, Deutschland

4.5 Antikörper:

Die Information zu den verwendeten Antikörpern ist folgendermaßen gegliedert:

Bezeichnung des Antikörpers

- Spezifität
- Isotyp
- Verwendung in dieser Arbeit
- Herkunft (Spezies)
- Quelle (Firma)

CD45 RA- Maus IgG 2a (FITC- konjugiert, Klon MEM 56)

- MEM 56: - erkennt ein in den CD45 Isoformen ABC (220 kD) und AB (205 kD)
vorkommendes Epitop, das durch Exon A des CD45 Gens kodiert wird
- IgG 2a
 - Anwendung zur Zellfärbung
 - Monoklonaler Antikörper aus der Maus
 - Caltag Laboratories; Bayshore Hwy. , Burlingame, CA, USA

CD45 R0- Maus IgG 2b (PE- konjugiert, Klon UCHL 1)

- UCHL 1: - erkennt die Isoform 0 des CD45 (180 kD) Proteins
- IgG 2b
 - Anwendung zur Zellfärbung
 - Monoklonaler Antikörper aus der Maus
 - Caltag Laboratories; Bayshore Hwy. , Burlingame, CA, USA

4.6 Antikörper zur Isotypenkontrolle

Maus IgG2a Isotypkontrolle

- erkennt ein beim Menschen nicht vorkommendes Epitop
- IgG 2a
- Anwendung zur Isotypenkontrolle
- Monoklonaler Antikörper aus der Maus, FITC-konjugiert
- Caltag Laboratories; Bayshore Hwy. ; Burlingame, CA, USA

Maus IgG2b Isotypkontrolle

- erkennt ein beim Menschen nicht vorkommendes Epitop
- IgG 2b
- Anwendung zur Isotypenkontrolle
- Myelom- Protein der Maus, PE- konjugiert
- BD Biosciences, San Jose, USA

Das komplette Exon A des CD45 Gens wurde mit folgenden Primern amplifiziert:

4.7 Primer:

MWG- Biotech AG; Ebersberg,
Deutschland

CD 45 RA- Hinprimer Primersequenz: 5'- ATT TAT TTT GTC CTT CTC CCA – 3'

CD 45 RA- Rückprimer Primersequenz: 5' – GTT AAC TTT TGT GTG CCA AC – 3'

4.8 Ansätze:

Elektrophorese- Puffer

Apotheke der FSU; Jena, Deutschland

Auftragpuffer (Loading Buffer)

pH 8-8,4

Zusammensetzung der 10fach konzentrierten Stammlösung:

Tris: 109,0 g

Borsäure: 54,4 g

EDTA 3,7 g

ad 1 l autoklaviertem Wasser

Der gebrauchsfertige Elektrophoreselaufpuffer setzt sich aus 1 Teil Laufpuffer und 9 Anteilen destilliertem Wasser zusammen.

Lysereagenz

Becton Dickinson; San Jose, CA, USA

100 ml Lysereagenz wurde mit 900 ml destilliertem Wasser gemischt.

PBS

Sigma; Deisenhofen, Deutschland

Phosphate Buffered Saline

pH 7,4

1 Päckchen wurde in 1 l destilliertem Wasser gelöst.

5. Methoden

5.1 Durchflußzytometrie

Das Durchflußzytometer kann sehr vielseitig in der klinischen Diagnostik und in der Forschung eingesetzt werden. Das Gerät besteht aus einem Flüssigkeitssystem, einer optischen Einheit und elektronischen Elementen.

Im Vorfeld der durchflußzytometrischen Analyse werden zunächst Zellen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern inkubiert, die gegen definierte Antigene gerichtet sind. Je nach Präsenz der ausgewählten Antigene binden die Antikörper und markieren somit die Zelle. Die Bindungsintensität der Antikörper kann mit dem Durchflußzytometer analysiert werden. Hierfür wird die Zellsuspension in einen Puffer aufgenommen. Mittels Druckluft werden die Zellen durch eine Kapillare in eine Probenkammer geschleust. Durch eine Trägerflüssigkeit wird ein Hüllstrom erzeugt, der wiederum in der Probenflüssigkeit mit den Zellen eine laminare Strömung hervorruft. Dadurch durchläuft jede Zelle einzeln die Probenkammer und passiert durch hydrodynamische Fokussierung präzise den Laserstrahl. Durch diesen werden die Zellen zur Eigenfluoreszenz angeregt.

Beim Passieren der Zelle durch den Laserstrahl kann eine charakteristische Kombination von optischen Eigenschaften aufgezeichnet werden. Diese werden in zwei Kategorien unterteilt: das Streulicht und die Fluoreszenz.

Bei ersterer handelt es sich um eine Lichtbrechung in Richtung des Laserstrahls (Forward- Scatter, FSC) sowie in eine Brechung orthogonal auf diese Richtung und auf die Richtung des Flüssigkeitsstroms (Side- Scatter, SSC).

Die Vorwärtsstreuung gibt Auskunft über die Zellgröße, während das Maß der Seitwärtsstreuung von der Granularität und Membranfaltung der Zellen abhängig ist.

Bei der zweiten optischen Eigenschaft, der Fluoreszenz, handelt es sich um die Lichtenergie, die nach Strahlungsabsorption durch ein Fluorochrom in Form von Emission wieder freigesetzt wird. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Antikörper sind mit den Fluoreszenzfarbstoffen Fluoresceinisothiocyanat (FITC) und Phycoerythrin (PE) gekoppelt. Diese Farbstoffe werden durch das vom Laser generierte monochromatische Licht mit der Wellenlänge 488 nm zur Fluoreszenz angeregt und emittieren daraufhin Licht unterschiedlicher Wellenlänge. Das

Fluoreszenzspektrum von FITC weist ein Maximum bei 515 nm (gelb-grün), das von Phycoerythrin ein Maximum bei 580 nm (rot-orange) auf. Damit sind die Gipfel der Emissionsmaxima deutlich voneinander zu unterscheiden. Über Spiegel- und Filtersysteme werden die von jeder einzelnen Zelle ausgesandten Streulicht- und Fluoreszenzsignale gebündelt und auf Photoverstärkerröhren geleitet. Beim Auftreffen auf die Photoverstärkerröhren werden die optischen Signale in Spannungspulse umgewandelt und digitalisiert. Die digitalisierten Daten werden an den Computer weitergeleitet und mit Hilfe der Software Cell Quest (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) ausgewertet.

Die Cell Quest Software erlaubt, sogenannte Analysefenster zu setzen. Dabei können für die Zellen, die in dem Analysefenster liegen, simultan sechs Einzelparameter erfasst werden:

Fluoreszenzsignal 1 (Fluoresceinisothiocyanat, FITC)

Fluoreszenzsignal 2 (Phycoerythrin, PE)

Fluoreszenzsignal 3 (hier nicht verwendet)

Fluoreszenzsignal 4 (hier nicht verwendet)

Vorwärtstreulicht (FSC, Forward Scatter)

Seitwärtstreulicht (SSC, Sideward Scatter)

Durch die gleichzeitige Bestimmung dieser Parameter kann die gesamte Lymphozytenpopulation in der durchflußzytometrischen Analyse in Subpopulationen unterschiedlicher Art differenziert werden.

5.2 Färbeansatz für CD45

Zunächst wurde 1 µl CD45-R0-PE-markiert (UCHL1) bzw. 1 µl CD45-RA-FITC-markiert (MEM56) mit 9 µl PBS verdünnt.

Diese Verdünnungsstufe wurde zuvor durch eine Verdünnungsreihe ermittelt (siehe Ergebnisteil). Jeweils 1 µl der verdünnten Antikörper wurden zusammen mit 25 µl Spender- bzw. Patientenblut über 25-30 min in einem Eppendorfgefäß im Dunkeln inkubiert.

Danach wurde 1 ml Lysereagenz zum Ansatz pipettiert und weitere 10-15 min im Dunkeln inkubiert. Nach kurzem Zentrifugieren (7000 U/min; 5 min) wurde der Überstand abgenommen und verworfen und das Sediment gewaschen. Dazu wurde in jedes Eppendorfgefäß 1 ml

Waschpuffer (PBS) gegeben, erneut zentrifugiert (7000U/min; 5 min) und der Überstand abgenommen. Dieser Arbeitsschritt wurde dreimal wiederholt. Abschließend wurde das Zellsediment in 200 µl PBS aufsuspendiert.

Danach wurde die FSC, SSC- die emittierte grüne Fluoreszenz und die emittierte rote Fluoreszenz im FACS gemessen und als Zweifarbenpunktewolke dargestellt. Es wurden jeweils die Signale von 10000 Zellen am Durchflußzytometer aufgenommen.

In der vorliegenden Arbeit wurde als Durchflußzytometer das Gerät FACS Calibur der Firma Becton Dickinson, in Verbindung mit einem PC- System von Apple Macintosh verwendet.

Die Grundeinstellung des Zytometers wurde mittels CaliBRITE Beads der Firma Becton Dickinson und der FACScmp-Software vorgenommen. Zur Datenerfassung wurde die Software CELLquest der Firma Becton Dickinson genutzt.

5.3 Färbeansatz zur Isotypenkontrolle

Um eine unspezifische Bindung der monoklonalen CD45 Antikörper auszuschließen, wurde ein Isotypenkontrollfärbeansatz notwendig. Dieser Färbeansatz wurde von jeder Probe parallel zum CD45- Färbeansatz (4.2) mit durchgeführt. Dabei wurden jeweils 1 µl der Isotypenantikörper Maus IgG-2a (FITC-konjugiert) und Maus IgG-2b (PE-konjugiert) mit 9 µl PBS verdünnt, so dass die Isotypenkontrollantikörper in der gleichen Verdünnungsstufe wie der CD45RA mAK und der CD45R0 mAK eingesetzt wurden. Anschließend wurden jeweils 1µl 1:10 verdünnten Isotypantikörpern Maus IgG-2a und Maus IgG-2b zu 25 µl EDTA- Blut gegeben und über 25 min im Dunkeln inkubiert. Diese Antikörper binden an Epitope, die beim Menschen nicht vorkommen.

Danach wurde jeweils 1 ml Lysereagenz zum Ansatz pipettiert und weitere 15 min im Dunkeln inkubiert. Nach Zentrifugieren (7000 U/min) wurden die Überstände verworfen und die Zellsedimente mit 1 ml PBS gewaschen. Die Zellsuspensionen wurden danach erneut zentrifugiert und die Überstände wiederum verworfen. Dieser Arbeitsschritt wurde dreimal wiederholt. Im Anschluss daran wurden das Zellsediment in 200 µl PBS aufsuspendiert und abschließend im Durchflußzytometer gemessen. Dabei wurden 10000 Signale aufgenommen und mit der Software Cellquest von Becton Dickinson ausgewertet.

5.4 Isolierung von DNA aus Vollblut

Für die DNA Isolierung wurde der kommerziell erhältliche DNA- Isolierungstestkit Puregene der Firma Biozym verwendet.

Als Ausgangsmaterial dienten 300 µl Citratblut. Das Blut wurde mit 900 µl RBC- Lysereagenz versetzt. Der Ansatz wurde gut gemischt und unter zehnmaligem Wenden 3 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Durch diesen Schritt wurden die Erythrozyten lysiert während die Lymphozyten intakt blieben. Um die lysierten Erythrozyten von den vitalen Leukozyten zu trennen, wurde das Gemisch 1 min bei 13000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert und verworfen, das verbleibende Leukozytensediment wurde in 300 µl Zell- Lyse- Lösung aufsuspendiert, wodurch die Leukozyten lysiert und die DNA und Proteine aus den Leukozyten freigesetzt wurde.

Damit die Zellproteine gefällt und von der DNA getrennt werden konnten, wurden zur Probe 100 µl Protein- Präzipitationslösung gegeben. Um die Protein- Präzipitationslösung mit dem Zell- Lysat gut zu durchmischen, wurde der Ansatz 20 sec bei hoher Geschwindigkeit mittels Vortexer geschüttelt und 3 min bei 13000 U/min zentrifugiert. Danach bildeten die gefällten Proteine ein festhaftendes dunkelbraunes Sediment. Im Überstand befand sich die DNA. Der Überstand wurde in ein frisches Eppendorfgefäß pipettiert, in dem sich 300 µl 96%iges Isopropanol befanden.

Das Gemisch wurde fünfzigmal geschüttelt, wodurch die DNA ausgefällt und als weißer Faden sichtbar wurde. Die gefällte DNA wurde durch 1 minütiges Zentrifugieren bei 13000 U/min sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen. Die gefällte DNA wurde in 300 µl 70% Ethanol suspendiert und anschließend 1 min bei 13000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig abgenommen. Hierdurch ist die DNA von einer möglichen Proteinkontamination befreit worden. Anschließend wurde das DNA- Sediment mindestens 30 min bei Raumtemperatur an der Luft getrocknet. Danach wurde die getrocknete DNA in 50 µl destilliertem Wasser resuspendiert. Die suspendierte DNA wurde über Nacht bei Raumtemperatur gelagert. Am nächsten Tag wurde die DNA-Konzentration der Lösung durch eine photometrische Messung bestimmt.

5.5 Photometrie

Die Quantifizierung und Bestimmung der Reinheit der DNA erfolgte durch photometrische Messungen. Die Basen der Nukleinsäuren absorbieren monochromatisches UV- Licht von 260 nm, wodurch basierend auf dem Lambert- Beer'schen Gesetz, die Konzentration der Nukleinsäuren in einer Lösung bestimmt werden kann. Dies ist möglich, da durch das Lambert-Beer'sche Gesetz ein proportionaler Zusammenhang zwischen der Lichtschwächung (Extinktion) und der DNA- Konzentration beschrieben wird.

In der vorliegenden Arbeit wurde als Photometer der RNA/ DNA Calculator Gene Quant und die dazugehörigen Quarzküvetten der Firma Pharmacia verwendet.

Zur Bestimmung der Konzentration wurde das Photometer zunächst bei 260 nm mit Referenzküvetten geeicht, die 70 µl autoklaviertes Wasser enthielten. Anschließend wurden 70 µl der DNA enthaltenden Proben bei 260 nm gemessen und aus dem bestimmten Extinktionswert wurde die DNA- Konzentration in µg/ml ermittelt. Zusätzlich bestimmte das Photometer automatisch den Ratiowert, der Aussagen über die Reinheit der DNA machte. Dabei wurde das Verhältnis der Konzentration gelöster Stoffe bei Messungen mit 260 nm und 280 nm errechnet. Der optimale Ratiowert für hochreine DNA lag bei 1,6.

War er höher, sprach dies für eine erhöhte RNA- Kontamination, bei niedrigeren Werten lag eine verstärkte Proteinverunreinigung vor. Werte zwischen 1,2 und 2,0 wurden toleriert. Lagen die Werte außerhalb dieser Grenzen wurde die DNA- Isolierung wiederholt.

5.6 PCR- Reaktion

In dieser Arbeit wurde ein genomischer Sequenzabschnitt des CD45 Gens analysiert. Die Analyse konzentrierte sich auf Exon A des CD45 Gens, da an Position 77 von Exon A die Punktmutation lokalisiert ist, die zum varianten CD45RA Expressionsmuster führt.

Für die Analyse wurde die Polymerase- Ketten- Reaktion (PCR) benutzt, eine 1986 von Kary B. Mullis eingeführte Methode, mit der DNA- Abschnitte in vitro vervielfältigt werden können.

Diese Technik verwendet als Bestandteile eine thermostabile DNA- Polymerase (Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus*), Desoxyribonukleotidtriphosphate und spezifische Oligonukleotide (Primer), die in einem magnesiumchloridhaltigen Puffer gelöst sind. Durch die Oligonukleotide wird festgelegt, welcher Bereich der Ausgangs- DNA amplifiziert werden soll. In der vorliegenden Arbeit wurden die Oligonukleotide so ausgewählt, dass die komplette Sequenz von Exon A des CD45- Gens amplifiziert wurde. Das Amplifikationsverfahren unterteilte sich im Allgemeinen in drei Schritte: Denaturierung der Doppelstrang- DNA (bei 94°C), Anlagerung der Oligonukleotide an die Einzelstrang- DNA (bei 61°C, 58°C und 55°C) und Synthese eines DNA- Doppelstranges durch die Taq- Polymerase (bei 72°C), wobei die Synthese am jeweiligen 3'- Ende des Oligonukleotids begann und nach der Vorlage des DNA- Einzelstranges durchgeführt wurde. Diese Zyklusabfolge wurde mehrfach hintereinander wiederholt, wodurch das Exon A des CD45- Gens exponentiell vermehrt werden konnte.

Der verwendete, 40 µl umfassende PCR- Ansatz bestand aus folgenden Komponenten: 18 µl DNA, 15 µl Master- Mix, je 3 µl Primer (Hin bzw. Rück) und 1,5 µl Taq- Polymerase.

Folgendes Amplifikationsprofil wurde verwendet:

Tab 5.1: Amplifikationsprofil der PCR

1. Sequenz:

Ein Zyklus	
Temperatur	Zeit
94°	5 min 20 sec
61°C	1 min
72°C	1 min

2. Sequenz:

Ein Zyklus	
Temperatur	Zeit
94°C	20 sec
58°C	1 min
72°C	1 min

3. Sequenz:

26 Zyklen	
Temperatur	Zeit
94°C	20 sec
55°C	1 min
72°C	1 min

Die PCR wurde mit einer 5 minütigen Auffüllphase bei 72°C und anschließendem Abkühlen auf 4°C abgeschlossen.

Die Amplifikation wurde in einem Thermocycler der Firma Biozym durchgeführt, der die Proben präzise auf die Temperaturen erhitzte bzw. kühlte, die für den jeweiligen Schritt notwendig waren.

5.7 Ausfällen der DNA- Amplifikate

Nach Beendigung der PCR wurden von dem 40 µl umfassenden PCR- Ansatz 30µl entnommen. Die übrigen 10 µl wurden zunächst im Kühlschrank aufbewahrt, um später als unverdaute Kontrollprobe verwendet zu werden.

Zu den 30 µl wurden 3 µl einer 3 M Natriumacetat- Lösung (pH 5,16) und 75 µl 96%iges Ethanol gegeben. Bei -20°C fällte die DNA über Nacht aus.

Daraufhin wurde die gefällte DNA 15 min bei 13000 U/min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Reinigung des DNA- Sediments erfolgte durch Aufsuspendieren in 200 µl 80%igem Ethanol. Nach erneutem 15 minütigem Zentrifugieren bei 13000 U/min wurde der Überstand wiederum dekantiert und die DNA 25 min an der Luft getrocknet.

5.8 Ansatz der RFLP- Analyse für die Genotypendiagnostik

Bei der RFLP-Analyse wird DNA mit einem Restriktionsenzym behandelt. Dieses erkennt eine spezifische Basenabfolge, die meistens aus 4-8 Basenpaaren besteht. Falls die, durch das Restriktionsenzym vorgegebene, spezifische Basenabfolge in der DNA vorhanden ist, wird sie dort durch das Restriktionsenzym gespalten, so dass DNA-Fragmente entstehen.

In der vorliegenden Arbeit wurden die PCR- Produkte mit der Restriktionsendonuklease *Msp I* (aus *Moroxella spez.*) behandelt. Die Erkennungssequenz des Enzyms ist die Basensequenz CCGG, so dass die Amplifikate beim Auftreten dieser Sequenz zerschnitten wurden. Folgende Schritte wurden dabei durchgeführt.

Nachdem die DNA- Amplifikate ausgefällt und der restliche Alkohol komplett abgedampft war, wurde die getrocknete DNA in 8 µl autoklaviertem Wasser aufgenommen. Zu diesen 8 µl wurden 1 µl L-Puffer, sowie 1 µl Restriktionsendonuklease *Msp I* gegeben. Der Ansatz wurde 4 h bei 37°C inkubiert. Während dieses Zeitraums wurden die Proben kontinuierlich durch einen Thermomixer mit 600 U/min geschüttelt.

Anschließend wurde nochmals 1 min mit 13000 U/min zentrifugiert. Durch Hinzufügen von 2 µl Auftragpuffer (pH 8-8,4) wurde die Reaktion gestoppt. Der komplette Ansatz wurde auf ein 4%iges MetaPhor®- Agarose- Gel aufgetragen und abschließend einer Gelelektrophorese unterzogen.

5.9 Gelelektrophorese

Für das Gel wurden 8 g MetaPhor®- Agarose in 200 ml Gelelektrophoreselaufpuffer aufgelöst. Nach einer Quellzeit von 15 min wurde sie jeweils 2 min bei mittlerer, danach 2 min bei maximaler Stärke in einer Mikrowelle aufgeköcht und anschließend mit 100 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) gemischt.

Die gelöste MetaPhor®- Agarose wurde luftblasenfrei in einen, zuvor mit Klebeband versiegelten Gelträger gegossen. Anschließend wurde der Probenauftragskamm in die Gellösung eingebracht. Das Gel polymerisierte ca. 40 min aus und wurde anschließend in eine Gelkammer eingebracht, die mit Gelelektrophoreselaufpuffer gefüllt war. Im Wechsel wurden stets 10 µl *Msp I*- verdaute, neben 10 µl unverdaute Probenansätze, sowie abschließend 10 µl Elektrophoresemarker aufgetragen. Bei 256 V und 40 min Laufzeit wanderten die einzelnen DNA- Fragmente von der Kathode zur Anode und wurden abhängig von ihrer Größe im Gel aufgetrennt.

5.10 Fotografie

Ethidiumbromid lagert sich selektiv in Doppelstrang- DNA ein und färbt diese an. Dadurch wurden die Banden im Gel unter UV-Licht sichtbar und konnten photographisch dokumentiert werden.

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel in einer Dunkelkammer mit UV- Licht bestrahlt und die mit Ethidiumbromid angefärbten DNA- Banden zur Fluoreszenz angeregt.

Anschließend wurde das Gel mit einer Polaroid- Kamera fotografiert (Belichtungszeit 1 sec.). Nach ca. 2 min wurden die DNA- Banden auf dem 667- Polapan- Film sichtbar.

5.11 Statistik

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgt mit Hilfe des Fisher- Exakt- Testes, da die Häufigkeitsverteilung in den einzelnen Quadranten unter 5% lag. Bei einem p-Wert von $<0,05$ lag Signifikanz vor.

6. Ergebnisse

6.1 Identifizierung der Lymphozytenpopulation im Durchflußzytometer

Das CD45 Molekülsystem ist eine Familie von Zellmembranmolekülen, die von allen Leukozyten und ihren Vorläufern, nicht aber von anderen Zellen exprimiert werden (Thomas und Lefrancois, 1988). Die Leukozytenpopulation unterteilt sich grob in eine Granulozytenpopulation, Monozytenpopulation und eine Lymphozytenpopulation. In der Arbeit beschränkten sich die Analysen zum CD45RA und CD45R0 Expressionsmuster auf die Lymphozytenpopulation. Mit dem Durchflußzytometer besteht die Möglichkeit, die Leukozytenpopulation separat zu analysieren, da die Zellen der jeweiligen Population beim Passieren des Laserstrahls ein individuelles Vorwärtsstreulicht und Seitenstreulicht abgeben. Werden diese beiden Parameter in einer Zweipunktewolke gegenübergestellt, so lässt sich die Leukozytenpopulation in die genannten Subpopulationen unterteilen. Ein typisches Ergebnis dieser Auftrennung ist in Abbildung 6.1 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass sich drei verschiedene Populationen voneinander abgrenzen lassen, die in der Abbildung markiert sind. Population 1 enthält Lymphozyten, Population 2 Monozyten und Population 3 Granulozyten. Die Populationen unterscheiden sich in der Zellgröße und Zellgranularität. Durch diese Merkmale werden das Vorwärtsstreulicht und das Seitenstreulicht definiert. Aus diesem Zusammenhang resultiert die in Abbildung 6.1 dargestellte Populationsauftrennung. Da die Lymphozytenpopulation in der Vorwärtsstreulicht / Seitenstreulicht- Zweipunktewolke (Dot Plot) eine separate, klar abgrenzbare Population abgibt, lässt sich ein Analysefenster um die Population legen. Solche Analysefenster sind in der Arbeit verwendet worden, um das CD45RA / CD45R0 Expressionsmuster für die Lymphozytenpopulation zu erfassen.

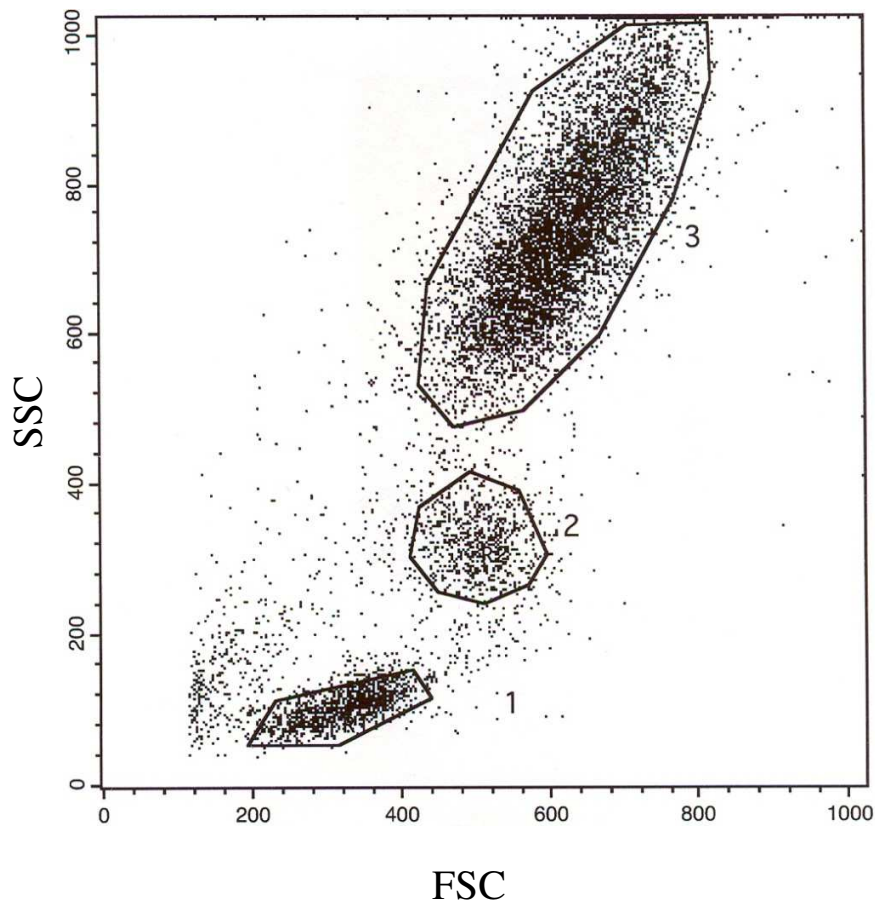


Abb. 6.1: Darstellung unterschiedlicher Leukozytenpopulationen in einer Zweipunktewolke

Es wurde von 10000 Zellen das Vorwärtstreulicht (FSC) und das Seitenstreulicht (SSC) aufgenommen. Die Lymphozytenpopulation (1), Monozytenpopulation (2) und Granulozytenpopulation (3) sind jeweils markiert.

Auf Grund unterschiedlicher Größe und Zellstruktur gibt jede Zelle nach Passieren eines Laserstrahls ein charakteristisches Streuungssignal ab, und wenn sie mit einem fluorochrom-markierten Antikörper beladen ist, ein zusätzliches Fluoreszenzsignal.

Durch Vorgabe bestimmter Messbereiche („Gating“) ist es möglich, nur solche Zellen zu analysieren, die mit ihren Messdaten in das vorgesehene Analysefenster („Gate“) fallen. Durch

differente Streulichteigenschaften konnten die Lymphozyten (Gate 1), Monozyten (Gate 2) und Granulozyten (Gate 3) identifiziert und nach entsprechendem „gating“ separat untersucht werden. In dieser Arbeit wurde sich jedoch ausschließlich auf die Analyse der Lymphozyten (Gate 1) beschränkt.

6.2 Verdünnungsreihen

In der Arbeit wurden die CD45RA- Expression und die CD45R0- Expression auf Lymphozyten mit den monoklonalen Antikörpern MEM56 und UCHL1 bestimmt. Um die optimale durchflußzytometrische Anfärbekonzentration für die verwendeten mAk MEM56 und UCHL1 zu ermitteln, wurden Verdünnungsreihen durchgeführt. Dabei wurde zunächst jeweils 1 µl des mAk mit PBS in den Konzentrationen 1:10; 1:20 und 1:100 verdünnt. Anschließend wurde jeweils 1 µl des Antikörpers bzw. des verdünnten Antikörpers mit 25 µl Spenderblut in einem Eppendorfgefäß über 25 Minuten im Dunkeln inkubiert. Die Färbeansätze wurden danach, wie in Material und Methoden beschrieben, weiter bearbeitet.

Letztendlich wurden in einem Histogramm die Fluoreszenzsignale der Lymphozyten, die sich mit dem mAk MEM 56 FITC und dem mAk UCHL 1 PE in den verschiedenen Verdünnungsstufen ergaben, aufgenommen. Die mittleren Fluoreszenzintensitäten für die verschiedenen Verdünnungsstufen sind in den Abbildungen 6.2 a und 6.2 b dargestellt.

Beim mAk UCHL 1 zeigt sich, dass die mittleren Fluoreszenzintensitäten für den unverdünnten Ansatz und den 1:10 verdünnten Ansatz ähnliche Werte von 366 und 365 aufwiesen, während für die 1:20 und 1:100 verdünnten Ansätze deutlich niedrigere Werte von 308 und 55 ermittelt wurden (Abb. 6.2a).

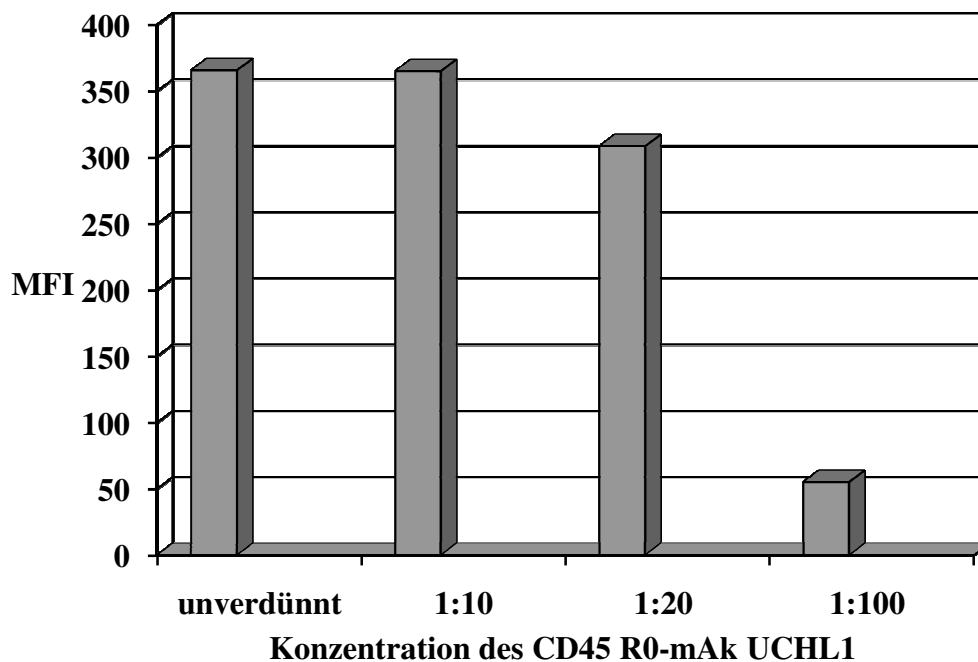


Abb. 6.2a

Die ähnlichen Werte für den unverdünnten und 1:10 verdünnten Ansatz weisen darauf hin, dass bei diesen Konzentrationen die Antikörper im Überschuss vorliegen und somit sämtliche Antigene absättigen können. Bei der 1:20 Verdünnung und der 1:100 Verdünnung kann der Antikörper die Antigene nicht komplett absättigen, wodurch diese Antikörperkonzentrationen für den Färbeansatz ungeeignet sind. In der Arbeit wurde auf Grund dieses Ergebnisses für den mAk UCHL1- PE eine 1:10 Verdünnung für sämtliche folgenden Färbeansätze gewählt. Ein analoges Ergebnis (Abb. 6.2b) wurde für den mAK MEM56- FITC erzielt, so dass hier ebenfalls eine 1:10 Verdünnung für sämtliche weiteren Färbeansätze verwendet wurde.

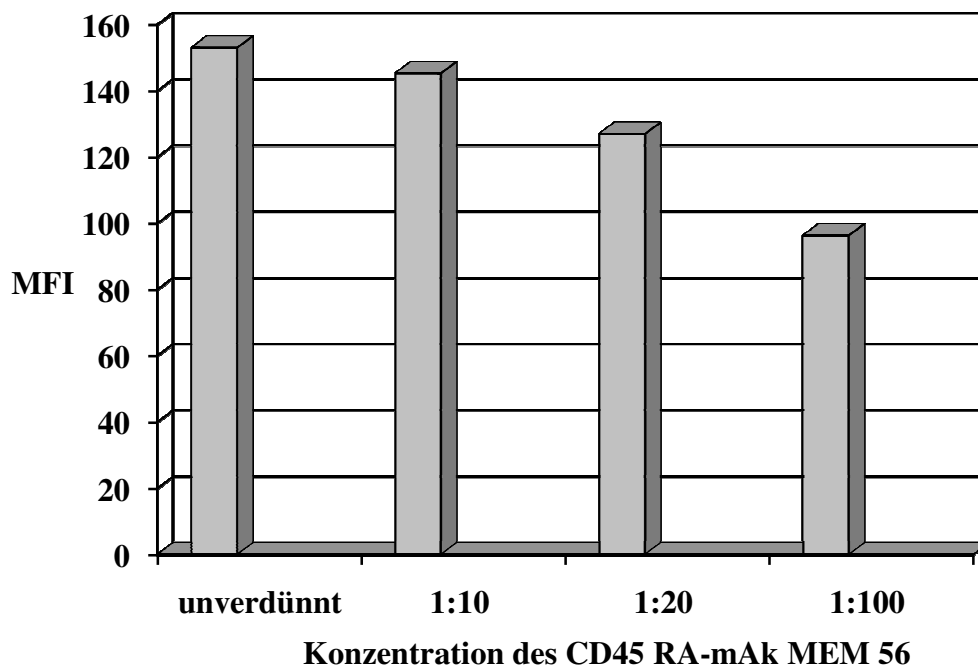


Abb. 6.2b

Abb. 6.2.a und b: Darstellung der mittleren Fluoreszenzintensitäten für den mAb UCHL1-PE (CD45R0) in a) und den mAb MEM56-FITC (CD45RA) in b) in Abhängigkeit unterschiedlicher Verdünnungskonzentrationen. Die Fluoreszenzintensitäten wurden für die Lymphozyten ermittelt, die durch ein FSC/SSC-Analysefenster identifiziert wurden (Abb. 5.1)

6.3 Isotypenkontrolle

Um eine unspezifische Bindung der monoklonalen Antikörper auszuschließen, wurde eine Isotypenkontrolle notwendig. 25 µl EDTA-Blut wurden mit jeweils 1µl 1:10 verdünnten Isotypantikörpern Maus IgG-2a (FITC-konjugiert, Isotyp wie CD45RA- Antikörper) und Maus IgG-2b (PE-konjugiert, Isotyp wie CD45 R0-Antikörper)) inkubiert. Diese Antikörper binden an Epitope, die auf humanen Lymphozyten nicht vorhanden sind. Beide Ansätze wurden einer Durchflußzytometrie unterzogen, in der die Antikörper, die an die Oberfläche menschlicher Lymphozyten gebunden waren, detektiert wurden. Falls die Isotypantikörper an die Lymphozyten binden, wird eine durchschnittliche Fluoreszenzintensität von mehr als 10^1 erwartet. Eine durchschnittliche Fluoreszenzintensität von weniger als 10^1 deutet auf keine Bindung der

Isotypantikörper an die Lymphozyten hin. Nach Inkubation der Blutprobe mit den Isotypantikörpern ist in Abbildung 6.3 ersichtlich, dass alle Signale im Negativbereich zwischen 10^0 und 10^1 liegen und deckungsgleich mit der Negativkontrolle sind. Sämtliche Signale, die durch die mAK UCHL1 und MEM56 erzielt wurden, sind daher spezifischer Natur.

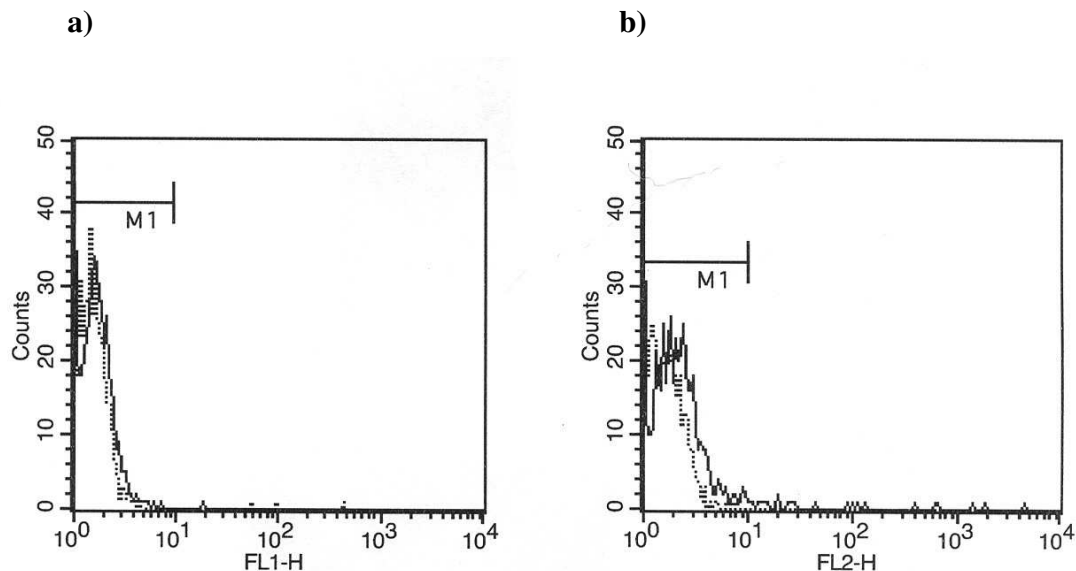


Abb. 6.3 Isotypenkontrolle für MEM56 a) und UCHL1 b)

Die durchgezogenen Linien stellen den Peak der Isotypenantikörper IgG2a (Isotyp wie CD 45 RA-Antikörper) a) und IgG2b (Isotyp wie CD45 R0-Antikörper) b) dar. Die gepunktete Linie kennzeichnet die Negativkontrolle (Ansatz ohne Ak).

6.4 Analyse von Lymphozytenpopulationen mit CD45RA/CD45R0 - Doppelfluoreszenzanalysen

Die Lymphozytenpopulation setzt sich aus NK-Zellen, B-Zellen, CD4⁺ T-Zellen und CD8⁺ T-Zellen zusammen. Den größten Anteil bilden dabei die T-Zellen (83,5%; Herold, 2005). T-Zellen besitzen eine außerordentliche CD45-Isoformvielfalt. Nicht-aktivierte T-Zellen exprimieren Isoformen mit Exon A kodierten Epitopen. Eine Aktivierung von T-Zellen induziert die Expression der Isoform 0 und führt gleichzeitig zu einer verminderten Expression von Isoformen mit Exon A kodierten Epitopen (Wallace et al., 1990). Im Rahmen der Zellaktivierung treten veränderte Spleißprozesse auf, die zu dieser unterschiedlichen Expression führen. Auf Grund dieser Tatsache können drei verschiedene T-Zellsubpopulationen mit unterschiedlichem

CD45RA und CD45R0 Expressionsmuster unterschieden werden. Die naiven oder nicht-aktivierten T-Zellen sind CD45RA positiv und CD45R0 negativ, die memory oder aktivierten T-Zellen sind CD45RA negativ und CD45R0 positiv und die dritte Population kennzeichnet T-Zellen, die sich im Übergangszustand von naiven zu memory T-Zellen befinden. Sie sind CD45RA positiv und CD45R0 positiv. Dem klassischen CD45RA Verteilungsmuster steht ein variantes CD45RA Verteilungsmuster gegenüber. Hier behalten die memory T-Zellen die CD45RA Expression, so dass die typische CD45RA negative memory T-Zellpopulation fehlt. Ein Ziel der Arbeit war es, die Frequenz des varianten CD45RA Expressionsmusters bei Patienten mit idiopathischer dilatativer Kardiomyopathie (n=104) im Vergleich zu einem Kontrollkollektiv (n=310) von gesunden Blutspendern zu analysieren. Da das variante CD45RA Expressionsmuster bei Lymphozyten im Durchflußzytometer mit dem mAk MEM56-FITC (CD45RA) und dem mAk UCHL1-PE(CD45R0) leicht zu identifizieren ist, wurden derartige Analysen von sämtlichen Probanden der Studie durchgeführt.

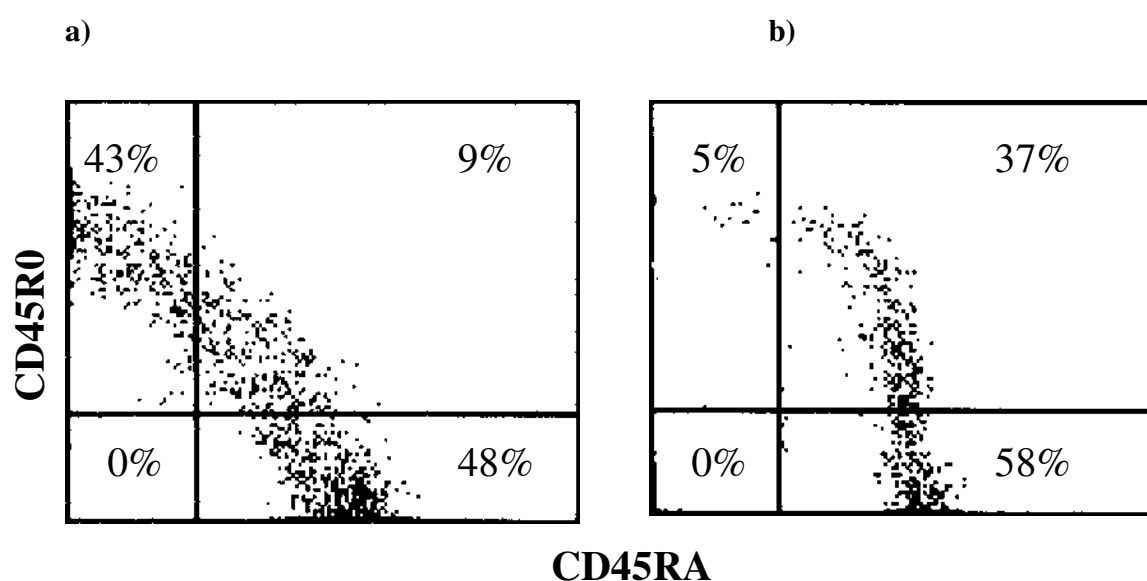


Abb. 6.4: Repräsentative CD45RA/CD45R0 Expressionsmuster bei Lymphozyten mit klassischem CD45RA Expressionsmuster (a) und variantem CD45RA Expressionsmuster (b). FSC/SSC identifizierte Lymphozyten wurden mit dem mAk MEM56-FITC (CD45RA) und dem mAk UCHL1-PE (CD45R0) angefärbt. Die Prozentzahlen stellen den Anteil der Lymphozyten für den jeweiligen Quadranten dar.

Abbildung 6.4a zeigt eine Doppelfluoreszenzanalyse von Lymphozyten mit dem klassischen CD45RA/CD45R0 Expressionsmuster. 43% der Lymphozyten sind CD45R0 positiv und CD45RA negativ (memory T-Zellen), 9% sind CD45R0 positiv und CD45 RA positiv (überwiegend T-Zellen auf dem Übergang von naiv zu memory) und 48% der Lymphozyten sind CD45RA positiv und CD45R0 negativ (überwiegend naive T-Zellen).

Im Gegensatz dazu zeigt Abbildung 6.4b das variante CD45RA Expressionsmuster. Die CD45 RA negative und CD45R0 positive Lymphozytenpopulation fehlt fast gänzlich. Nur 5% Lymphozyten repräsentieren das klassische Expressionsmuster der memory T-Zellen (CD45RA negativ und CD45R0 positiv). Für die CD45RA positive und CD45R0 negative Lymphozytenpopulation wurde ein Werte von 58 % ermittelt. 37% der Zellen waren CD45RA positiv und CD45R0 positiv. Das variante CD45RA Expressionsmuster trat im Patientenkollektiv 5 mal (4,8%) und im Kontrollkollektiv 8 mal auf (2,6%).

6.5 Nachweis der Punktmutation im Exon A des CD45 Gens durch RFLP-Analyse

Es ist bekannt, dass der variante CD45RA Phänotyp durch eine Punktmutation an Position 77 im Exon A des CD45 Gens verursacht wird. Diese Punktmutation verändert die Wildtypsequenz CCGG zu CCGG. Das Motiv CCGG wird von der Restikationsendonuklease *MspI* erkannt, so dass die Punktmutation eine zusätzliche Schnittstelle für *MspI* im Exon A erzeugt. Diese Tatsache wurde genutzt, um mit *MspI* in RFLP-Analysen (ASRA-Analysen) die Punktmutation nachzuweisen (Abb. 6.5).

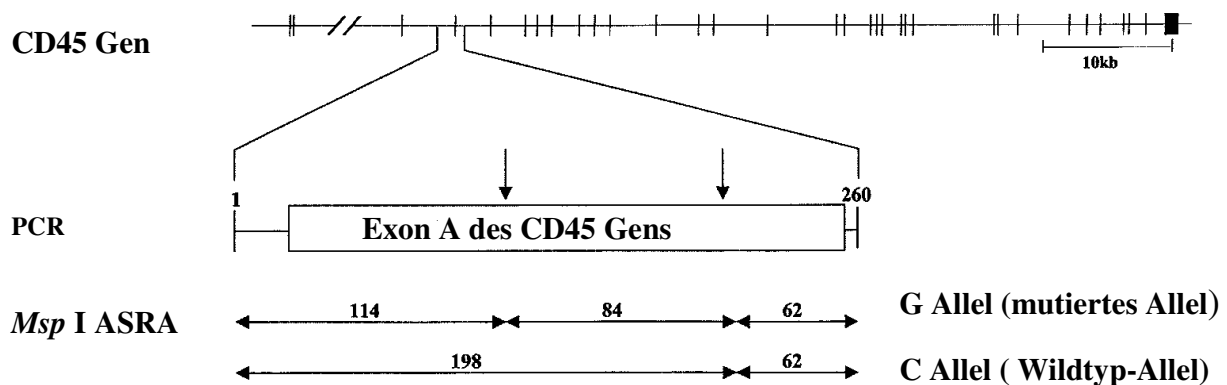


Abb. 6.5: Modell hafte Darstellung der PCR-RFLP-Analyse mit dem Restriktionsenzym *MspI* für die Identifizierung der Punktmutation im Exon A des CD45 Gens

Für diese Art von RFLP-Analysen wurde DNA isoliert und das komplette Exon A mit einem Primerpaar in der PCR amplifiziert. Das PCR-Produkt hatte eine Größe von 260 Bp. Es wurde mit *MspI* verdaut. Die Punktmutation an Position 77 entwickelt für das Restriktionsenzym *MspI* eine zusätzliche Schnittstelle (CCCG – CCGG), so dass die mutierte Sequenz in drei Fragmente mit Längen von 114Bp, 84 Bp und 62 Bp gespalten wurde. Das PCR-Produkt mit Wildtypsequenz wurde in zwei Fragmente mit 198 Bp und 62 Bp gespalten, da bei der Wildtypsequenz in dem amplifizierten Bereich keine zusätzliche Schnittstelle für *MspI* vorlag. Das Fragment mit der Größe von 62 Bp stellt ein Kontrollfragment für die Funktionstüchtigkeit der PCR-RFLP-Analyse dar. Es muss in jeder Analyse auftreten. Werden die einzelnen Fragmente in einem Gelsystem aufgetrennt, so gibt das Bandenmuster darüber Auskunft, ob ein nicht mutierter Genotyp, ein heterozygoter Träger oder ein homozygoter Träger der Mutation vorliegt.

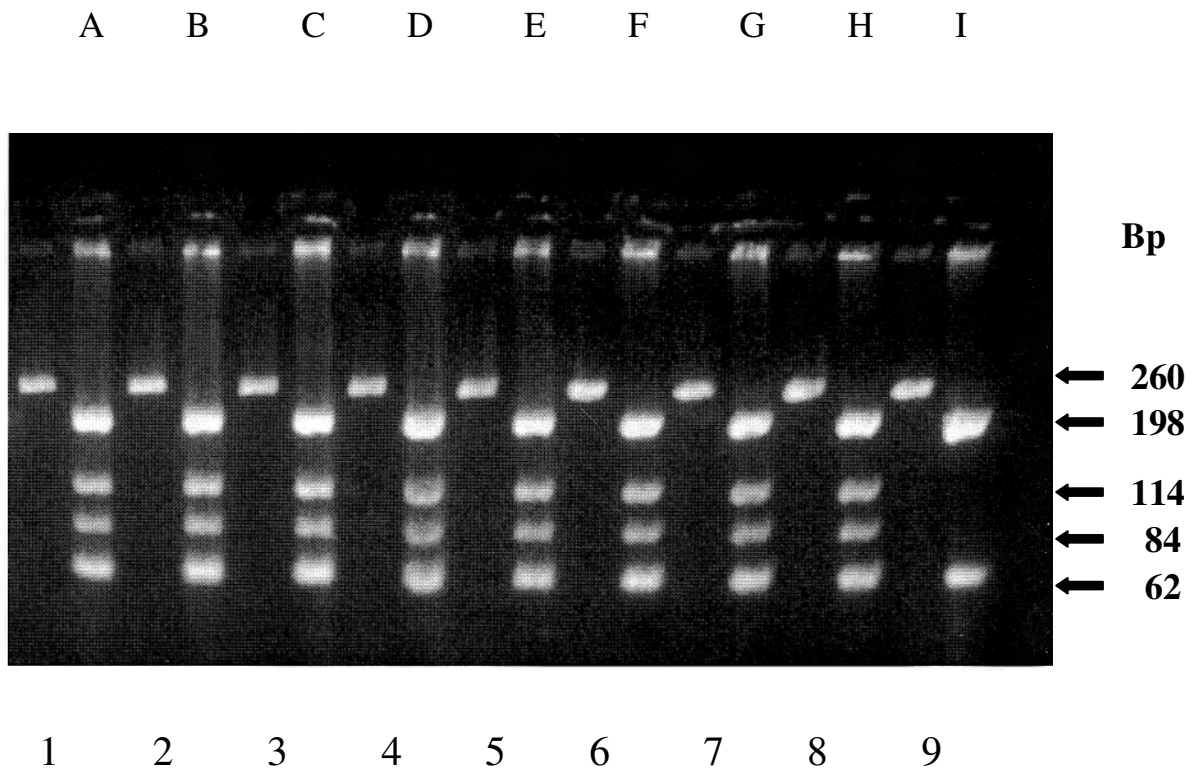


Abb. 6.6: Nachweis der Punktmutation (77C/G) in Exon A des CD45 Gens mit einer RFLP-Analyse unter Verwendung des Restriktionsenzym *MspI* bei 8 Individuen mit variantem CD45RA Expressionsmuster aus dem Kontrollkollektiv (Spuren A-H und Spuren 1-8) und einem Individuum mit klassischem CD45RA Expressionsmuster aus dem Kontrollkollektiv (Spur 9 und Spur I). Die Pfeile symbolisieren Fragmente mit zugehöriger Länge in Bp.

Im Wechsel wurden jeweils 10 µl unverdaute (Spur 1-9) neben 10 µl verdaute Amplifikate (Spur A-I) aufgetragen.

Mit der dargestellten PCR-RFLP Analyse wurde getestet, mit welcher Frequenz die Punktmutation im Patientenkollektiv und Kontrollkollektiv auftrat. Abbildung 6.6 zeigt die Analysen für die ermittelten 8 Kontrollindividuen mit variantem CD45RA Phänotyp aus der Kontrollgruppe. Es ist zu erkennen, dass bei sämtlichen Individuen mit variantem CD45RA Expressionsmuster Wildtypfragmente mit einer Länge von 198 Bp und mutationsspezifische Fragmente mit der Länge von 114 Bp und 84 Bp parallel auftraten. Dies bedeutet, dass sämtliche Kontrollindividuen mit variantem CD45RA Expressionsmuster die

Mutation in heterozygoter Form tragen. Ein homozygoter Träger der Mutation wurde bei den Kontrollindividuen mit variantem CD45RA Expressionsmuster nicht gefunden. Das Kontrollindividuum mit klassischem CD45RA zeigt nur das Wildtypfragment mit einer Länge von 198 Bp. Bei ihm fehlen mutationsspezifische Fragmente, so dass dieses Kontrollindividuum nicht die Mutation trägt. Dieses Ergebnis wurde für alle weiteren Kontrollindividuen mit klassischem CD45RA Expressionsmuster gefunden (nicht im Bild dargestellt).

Dieselben Analysen wurden für die Patienten mit DCM durchgeführt (Abbildung 6.7). Im Patientenkollektiv wurden 5 Individuen mit variantem CD45RA Expressionsmuster identifiziert. Die RFLP- Analysen für diese 5 Individuen und ein Patientenindividuum mit klassischem CD45RA Expressionsmuster sind in Abbildung 6.7 dargestellt. Die Abbildung dokumentiert, dass die Patienten mit variantem CD45RA Expressionsmuster die Punktmutation in heterozygoter Form tragen, weil mutationsspezifische Fragmente mit der Länge von 114 Bp und 84 Bp parallel mit dem wildtypspezifischen Fragment von 198 Bp auftraten. Das Patientenindividuum mit klassischem CD45RA Expressionsmuster zeigt nur das Wildtypfragment der Länge von 198 Bp. Dies ist ein repräsentatives Ergebnis, so dass festzuhalten bleibt, dass sowohl im Patientenkollektiv, als auch im Kontrollkollektiv, bei Individuen mit klassischem CD45RA Expressionsmuster die Punktmutation nicht vorkommt. Sie tritt nur bei Individuen mit variantem CD45RA Expressionsmuster auf. Dabei tragen diese Individuen die Mutation in heterozygoter Form, ein homozygoter Träger wurde in der gesamten Studie nicht gefunden.

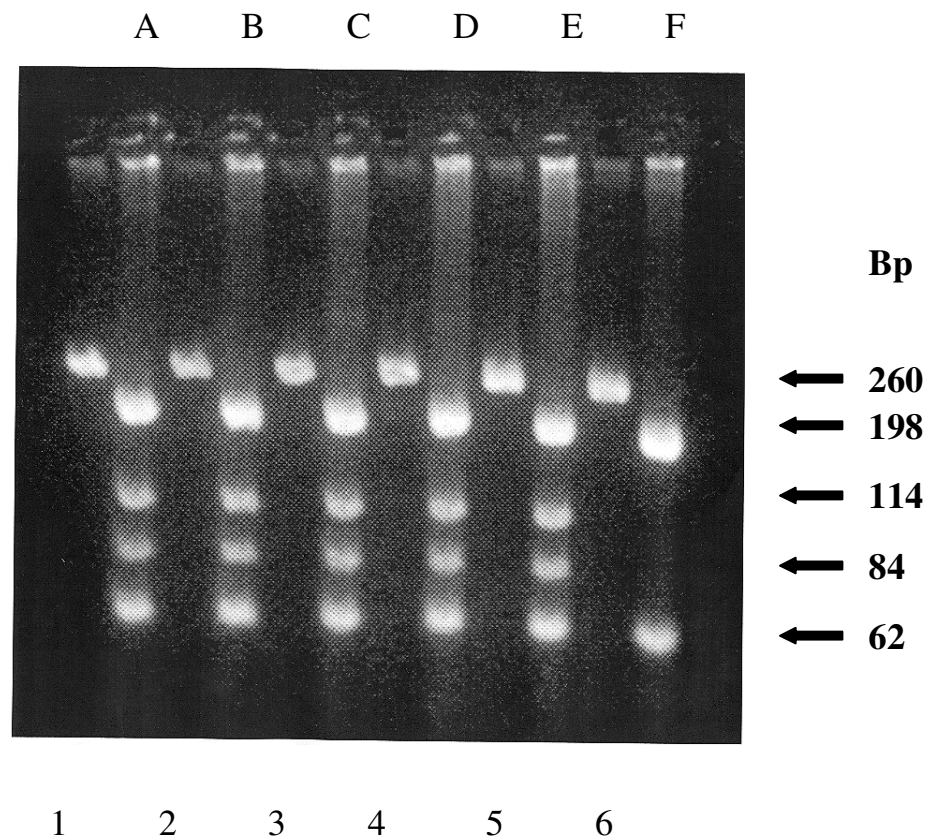


Abb. 6.7: Nachweis der Punktmutation (77C/G) in Exon A des CD45Gens mit einer RFLP- Analyse unter Verwendung des Restriktionsenzym *MspI* bei 5 Individuen mit DCM und variantem CD45RA Expressionsmuster (Spuren 1-5 und Spuren A-E) und einem Individuum mit DCM und klassischem CD45RA Expressionsmuster (Spur 6 und Spur F). Dabei wurden im Wechsel jeweils 10 µl unverdaute (Spur 1-6) neben 10 µl verdaute Amplifikate (Spuren A-F) aufgetragen. Die Pfeile symbolisieren Fragmente mit zugehöriger Länge in Bp.

6.6 Bestimmung der Allelfrequenz

In der vorliegenden Studie wurde eine mögliche Assoziation zwischen dem 77 C/G Polymorphismus und dem Auftreten der idiopathischen dilatativen Kardiomyopathie untersucht. Tabelle 6.1 zeigt die unterschiedliche Verteilung des CD45 C/G- Polymorphismus bei Patienten mit idiopathischer dilatativer Kardiomyopathie und Kontrollindividuen.

Tab. 6.1 Verteilung des CD45 C/G- Polymorphismus bei Patienten mit idiopathischer DCM und Kontrollkollektiv

Gruppe	C/G	C/C	Total	Allelfrequenz von G (%)
Idiopathische DCM	5 (4,8%)	99 (95,2%)	104	2,4
Kontrollkollektiv	8 (2,6%)	302 (97,4%)	310	1,3

Die Mutation trat häufiger bei Patienten, als in der Kontrollgruppe auf. Von den 104 untersuchten Patienten ließ sich der C/G Polymorphismus bei 5 (4,8%) nachweisen. In der 310 Individuen umfassenden Kontrollgruppe, fand sich die Mutation lediglich bei 8 Personen (2,6%). Da die Mutation ausschließlich heterozygot auftrat, bestand für 77G eine Allelfrequenz von 2,4% bei Erkrankten versus 1,3% bei gesunden Probanden.

Trotz des gehäufte Auftretens des Polymorphismus bei Patienten mit DCM lag, nach verwendeten doppelseitigen Fisher-Exakt-Test, keine Signifikanz ($p=0,327$) vor. Somit bestand kein signifikanter Unterschied in der Allelfrequenz von 77G zwischen Patienten- und Kontrollkollektiv. Dies wird als Schlüsselergebnis der vorliegenden Arbeit gewertet.

7. Diskussion

Die Genese der idiopathischen dilatativen Kardiomyopathie ist bislang nicht vollständig geklärt. Neben bekannten genetischen Faktoren (meist autosomal dominant vererbt), sind Umweltfaktoren (virale, autoimmune und toxische Schäden) von Bedeutung. In der vorliegenden Arbeit wurde die mögliche Assoziation einer Punktmutation im Exon A des CD45 Gens mit der Entstehung einer dilatativen Kardiomyopathie untersucht. Dabei handelt es sich um eine C → G-Transversion an Position 77 des Exon A, aus der ein variantes CD45 Expressionsmuster resultiert. Grundlage für diese Untersuchung sind die Forschungsergebnisse einer Marburger Arbeitsgruppe, die einen Zusammenhang zwischen der Punktmutation und der Entstehung der multiplen Sklerose nahelegen. Seit Veröffentlichung dieser Daten im Jahre 2000 beschäftigen sich zahlreiche Studien mit der Frage, inwiefern jene Mutation zu der Entstehung verschiedener Erkrankungen mit autoimmunologischer Beteiligung beiträgt. Aus diesem Grund wurde in der vorliegende Arbeit eine mögliche Assoziation dieser Punktmutation mit dem Auftreten einer idiopathischen dilatativen Kardiomyopathie untersucht, wobei die Resultate dieser Arbeit auf eine eher untergeordnete Rolle der Punktmutation für die Pathogenese der dilatativen Kardiomyopathie hin deuten.

7.1 Unterschiedliche Expressionsmuster der CD45 Isoformen

CD45 wurde 1989 von Matt Thomas und 1994 von Trowbridge ausgiebig beschrieben (Thomas 1989; Trowbridge et al., 1994). Damals war bekannt, dass CD45 eine typische Rezeptor-assoziierte Protein-Tyrosin-Phosphatase darstellt, die entscheidend an der Regulation der Signaltransduktion bei immunologischen Zellen beteiligt ist. In den letzten Jahren wurden zahlreiche neue Erkenntnisse über CD45 gewonnen. So ist heute bekannt, dass sich CD45, ein Glykoprotein, das von Lymphozyten und ihren Vorläuferzellen exprimiert wird, auf etwa 10% der Zelloberfläche befindet (Hermiston et al., 2003). Die zytoplasmatische Region des Glykoproteins zeigt eine etwa 95%ige Homologie bei allen Säugetieren, während dies für die extrazelluläre Domäne nur zu 35% zutrifft. Durch alternative Spleißprozesse der 3 Exons A, B und C resultieren multiple Isoformen im Bereich der extrazellulären Domäne. Die Isoformen sind abhängig vom Zelltyp und Aktivierungs- sowie Differenzierungszustand der Zellen. Bei humanen hämatopoetischen Zellen finden sich 5 verschiedene Isoformen. In der vorliegenden

Arbeit wurde das Expressionsmuster von CD45 auf T-Lymphozyten untersucht. Die Lymphozytenpopulation setzt sich aus B-Zellen, NK-Zellen, T-Helfer-Zellen (CD4-Zellen) und zytotoxischen T-Zellen (CD8-Zellen) zusammen. Frühere Untersuchungen zeigten, dass bei B-Zellen die Isoformen ABC, AB, BC und B vorkommen und NK-Zellen die Isoformen 0, ABC, AB und BC exprimieren (Hermiston et al, 2003). Da in dieser Arbeit überwiegend T-Lymphozyten untersucht wurden, soll auf die Isoformexpression dieses Zelltyps näher eingegangen werden. Durch die Aktivierung von T-Zellen wird eine Abnahme der Expression von Isoformen mit Exon A kodiertem Aminosäurebereich ausgelöst und parallel die Expression für die Isoform 0 induziert. Naive T-Zellen exprimieren hochmolekulare Isoformen wie ABC (220 kDa), AB (205 kDa), BC (200 kDa) und B (190 kDa). Auf aktivierten, oder memory-T-Zellen wird die niedermolekulare Isoform 0 (180 kDa) in verstärktem Maße exprimiert. Dies ist jedoch ein reversibler Zustand, denn memory-T-Zellen sind in der Lage, wieder hochmolekulare CD45-Isoformen zu re-exprimieren (Arlettaz et al, 1999). Das heißt, das auch ein einzelner Zelltyp, wie die T-Lymphozyten, verschiedene Isoformen repräsentieren kann (Penninger et al., 2001), was Einflüsse auf biologische Funktionen der Zelle, wie z.B. deren Zytokinproduktion und biochemische Signaltransduktionsketten, hat. Zytokine, wie z.B. Interferone oder Interleukine, besitzen neben einer antiviralen und antitumoralen auch eine immunmodulatorische Aktivität. So aktivieren sie natürliche Killerzellen, zytotoxische T-Zellen und Makrophagen. Da eine Änderung der Zytokinproduktion durch unterschiedliche Isoformen der exprimierten Oberflächenproteine möglich ist, sollte eine eventuelle Beteiligung ihrer, durch Mutationsprozesse entstandenen, varianten Isoformen an der Pathogenese autoimmunvermittelter Erkrankungen wie zum Beispiel der dilatativen Kardiomyopathie diskutiert werden.

7.2 Alternativen Spleißvorgänge bei CD45

1977 wurde beschrieben, dass Gene eukaryonter Zellen diskontinuierlich auf der DNA angeordnet sind. Es fanden sich bei der Hybridisierung Schleifen doppelsträngiger DNA, die nicht mit der mRNA in Wechselwirkung traten. Daraus musste geschlossen werden, dass Gene nichtcodierende "intervenierende" Sequenzen enthalten, die sogenannten Introns. Die in der mRNA erscheinenden und damit exprimierten Sequenzen wurden Exons genannt. Das korrekte Entfernen der nichtcodierenden Sequenzen des primären Transkriptes, sowie die Zusammenfügung der Exons zur funktionsfähigen mRNA stellt einen komplizierten Prozess dar,

der als konstitutives Spleißen bezeichnet wird und hier kurz erläutert werden soll. Das mechanistische Prinzip aller Spleißvorgänge beruht auf mehrfachen Umesterungen, wobei eine freie OH-Gruppe eines Nukleotids, meist innerhalb eines Introns lokalisiert, die Phosphodiesterbindung am Exon-Intron-Übergang angreift. Dadurch kommt es an dieser Stelle zum Bruch des RNA-Stranges. Das entstandene freie 3'-Ende des ersten Exons greift nun am Übergang zum Exon II an, wodurch das Intron entfernt und die beiden Exons verspleißt werden. Im Prinzip hat die RNA selbst die nötige katalytische Aktivität für diesen Vorgang. Dabei bildet die komplexe Raumstruktur der RNA eine wesentliche Voraussetzung für das richtige Auffinden der Verspleißungsstellen. Ein derartiges, proteinfreies Spleißen von RNA-Molekülen wurde bislang jedoch nur bei einfachen Eukaryonten nachgewiesen. Bei höheren Eukaryonten ist für das korrekte Spleißen der hnRNA ein komplexer Apparat notwendig, bei dem Ribonucleotidproteine benötigt werden und der als Spleißosom bezeichnet wird. Für das korrekte Spleißen sind auf der hnRNA leicht variable Sequenzen notwendig, die auch Consensussequenzen genannt werden. Für den Spleißvorgang werden kleine RNA-Moleküle, die snRNA's, benötigt. Diese liegen im Komplex mit Proteinen vor, weshalb sie auch als snRNP's bezeichnet werden. Der Spleißvorgang beginnt damit, dass das snRNP U1 an eine Consensussequenz am 5'-Ende des Introns bindet, die stets mit den zwei Basen GU anfängt. Diese Bindung wird dadurch spezifisch, dass die RNA des U1 snRNP mit der Consensussequenz hybridisiert. Im nächsten Schritt bindet das snRNP U2 an eine innerhalb des Introns, meist in der Nähe des 3'-Endes gelegene Consensussequenz aus sieben Basen. Die Anlagerung der snRNP's U4, U5, U6 bringt U1 und U2 in enge Nachbarschaft und erzeugt die strukturelle Voraussetzung dafür, dass sich eine Lassostruktur durch Verknüpfung einer Phosphodiesterbindung mit der 5'-terminalen GU-Sequenz bilden kann, die das 3'-OH-Ende des Exons 1 freilegt. Während dieses Schrittes wird das snRNP U1 freigesetzt. Die freie 3'-OH-Gruppe des Exons 1 greift anschließend am Intron-Exon-Übergang an, womit das in Lassostruktur vorliegende Intron entfernt und nach Abdissoziation der Faktoren U2, U4, U5 und U6 abgebaut wird. (Löffler, Petrides; 1998). Neben snRNP's sind auch SR- Proteine als Spleißfaktoren wichtiger Bestandteil der Spleißosomen. Dabei handelt es sich um Proteine, die durch ein oder zwei N-terminale RNA-Erkennungs-Motive und eine C-terminale Arginin- und Serin- reiche Domäne charakterisiert sind. SR-Proteine sind sowohl für konstitutive, als auch alternative Spleißprozesse essentiell. So erleichtern sie u.a. die Bindung von U1 snRNA an das 5'-Ende des Introns und stabilisieren die, für den Spleißvorgang wichtige, Lassostruktur. Die SR- Proteine sind bei unterschiedlichen

Spezies hochkonserviert, werden gewebeabhängig exprimiert und durch Phosphorylierung reguliert (Dam et al., 2000).

Da CD45 alternativen Spleißprozessen unterliegt, erlaubt die unterschiedliche Verspleißung der Exons 4, 5 und 6 aus einer prä-mRNA die Produktion von insgesamt 8 möglichen Isoformen. Während in Zellen von Mäusen alle 8 Isoformen isoliert werden konnten, wurden in menschlichen Zellen nur 5 Isoformen identifiziert. Wichtige Regulationselemente im alternativen Spleißprozess für CD 45 sind *Trans*-agierende Spleißfaktoren (Wang et al., 2001; Tsai et al. 1989). Diese Faktoren erkennen *cis*-Elemente im Exon 4 und 6 und bewirken durch die Bindung an das jeweilige *cis*-Element die Eliminierung dieser Exons aus der unreifen RNA. Im Exon 4 fanden sich insgesamt 3 Regionen (Position 8-10, 40-91 und 127-137; insgesamt 198 Bp), die als *cis*-Elemente fungieren. Im Exon 6 befindet sich ein großes Segment aus 144 Bp an Position 16-137, das essentiell für das gewebespezifische alternative Spleißen der prä-mRNA ist. In Exon 5 gelang die Isolierung einer solchen Sequenz bislang nicht, weshalb aktuell davon ausgegangen wird, dass das Spleißen von Exon 5 keiner gewebespezifischen Regulation unterliegt. Dawn et al. zeigten, dass verschiedene SR- Proteine als *trans*-agierende Spleißfaktoren antagonistische Effekte auf das alternative Spleißen von CD45 besitzen. So unterstützen die SR-Proteine SRp20 und 9G8 die Inklusion der Exons 4 und 6. Dies führt zu einer vermehrten Expression der Isoformen ABC bzw. AB. Das Herausschneiden der Exons wird durch die *trans*-agierenden Spleißfaktoren SC35, SF2ASF, SRp30c, SRp40, SRp75 und U2AF26 gefördert (Dawn et al., 2000 ; Heyd et al., 2006), woraus eine vermehrte Expression der Isoform 0 resultiert. Des Weiteren wurden in verschiedenen Studien Exon-Splicing-Enhancer (ESE) und Exon-Splicing-Silencer (ESS) innerhalb der *cis*-Elemente der Exons A, B und C von CD45 beschrieben, die für den alternativen Spleißvorgang dieses Oberflächenproteins von großer Bedeutung sind (Jumaa et al., 1997; Tong et al., 2005). Während ESE für die Inklusion der Exons 4 bzw. 6 von Bedeutung sind, spielen ESS eine Rolle bei deren Entfernung. Heute ist bekannt, dass die Interaktionen der *trans*- agierenden Spleißfaktoren mit diesen Abschnitten der unreifen CD45 RNA wichtig für alternative Spleißprozesse und damit für die unterschiedlichen Expressionsmuster von CD45 sind. Durch Aktivierung binden Spleißfaktoren wie z.B. SC35 (Wang et al., 2001), SF2ASF, SRp30c oder SRp40 an diese Strukturen und beeinflussen den Spleißprozess so, dass ein Switch zu CD45 T-Zellen eingeleitet wird, die die Isoformen B und 0 exprimieren (Tong et al., 2005). Weiterhin ist bekannt, dass sich die Konzentration der *trans*-agierenden Spleißfaktoren

SRp30c, SRp40 und SRp55 im Rahmen der T-Zellaktivierung signifikant verändern (Screaton et al., 1995). Inwieweit die Spleißreaktionen für CD45 durch diese Konzentrationsveränderungen modifiziert werden, ist bislang nicht genau geklärt.

Es ist bekannt, dass bei aktivierten T-Zellen die Isoformenvielfalt auf die Isoformen B und 0 beschränkt ist. Bei Personen mit variantem CD45RA-Expressionsmuster wird die Isoform AB zusätzlich zu den Isoformen B und 0 exprimiert. Dies legt nahe, dass bei Individuen mit dem regulatorischen Polymorphismus der CD45RA-Expression Regulationsvorgänge für das alternative Spleißen von CD45 verändert sind.

Unterschiedliche Literaturdaten deuten darauf hin, dass dem varianten CD45RA-Expressionsmuster eine Punktmutation an Position 77 Exon 4 zugrunde liegt (Tchillian et al., 2001; Nam et al., 2005; Holmes et al., 2005). Dabei findet ein Nukleotidaustausch von C zu G statt. Das mutierte Kodon 26 kodiert mit CCG nach wie vor für die Aminosäure Prolin. Somit handelt es sich bei der Transversion um eine neutrale Mutation, denn auch der Wildtyp kodiert für die Aminosäure Prolin. Weiterhin werden durch die Punktmutation keine zusätzlichen Donor- oder Akzeptorspleißstellen entwickelt. Die Punktmutation betrifft die Position 77 des Exon A (Exon 4). Das hier vorhandene *cis*-Element beinhaltet ein ESS, dessen Nukleotidsequenz durch den Basenaustausch C zu G verändert wird (Tong et al. 2005). Durch diese Änderung der Nukleotidsequenz ist die Interaktion zwischen dem entsprechenden *trans*-agierenden Spleißfaktor und dem ESS gestört. Eine gestörte Wechselwirkung wäre beispielsweise durch eine Veränderung der räumlichen Struktur der Bindungsstelle denkbar. Durch die Punktmutation im Exon A wird eine zusätzliche GC Basenpaarung möglich, wodurch die Ausbildung einer haarnadelähnlichen Sekundärstruktur bei der unverzweigten und einzelsträngigen RNA wahrscheinlicher wird. Eine solche Sekundärstruktur verhindert eventuell eine Wechselwirkung zwischen dem beschriebenen *cis*-Element und dem *trans*-agierenden Spleißfaktor, weshalb Exon 4 nicht aus der unreifen prä-mRNA herausgespleißt wird. Während aktivierte Wildtyp-T-Lymphozyten ausschließlich die Isoform 0 exprimieren, findet sich auf T-Lymphozyten mit der C G Transversion zusätzlich die Isoform A. In der vorliegenden Arbeit wurden bei allen Probanden die Expression von Exon A- spezifischen Sequenzen nachgewiesen, die in der Isoform A vorhanden sind. Mit Hilfe der Durchflußzytometrie konnten 8 Individuen im Kontrollkollektiv und 5 Individuen im Patientenkollektiv mit variantem CD45RA- Expressionsmuster ermittelt werden. Nachdem mittels PCR die komplette Sequenz des Exon A amplifiziert wurde, zeigte die anschließende RFLP-Analyse, dass alle ermittelten Individuen mit variablem

Phänotyp, sowohl im gesunden Kontrollkollektiv, als auch im Patientenkollektiv, die C G Punktmutation an Position 77 dieses Exons aufwiesen. Um ein zufälliges Auftreten der Mutation bei Individuen mit variantem Phänotyp auszuschließen, wurde auch die DNA von Wildtyp-T-Lymphozyten einer PCR mit anschließender RFLP-Analyse unterzogen. Bei keinem der Individuen mit Wildtyp-CD45RA-Expressionsmuster konnte die beschriebene Punktmutation nachgewiesen werden. Diese Daten deuten auf einen direkten Zusammenhang zwischen der Transversion von C zu G an Position 77 des Exon A und dem varianten CD45RA-Expressionsmuster hin und unterstützen die bereits vorliegenden Literaturdaten. 2002 berichteten Jacobsen et al. über eine zweite Punktmutation, die in einem varianten CD45RA-Expressionsmuster resultiert. Sie beschreiben den Austausch der Basen Cytosin gegen Adenin an Position 59 des Exon A (C59A). Dadurch treten, wie auch bei der C77 G Transversion, alternative Spleißprozesse auf, die zu einem varianten CD45RA-Expressionsmuster führen (Jacobsen et al. 2002). Da diese zweite Punktmutation jedoch nicht Bestandteil der vorliegenden Studie war, kann keine Aussage getroffen werden, ob Patienten mit variantem CD45RA-Expressionsmuster neben der detektierten C77G Transversion die C59A Punktmutation aufwiesen. 2004 wurde von einer weiteren Punktmutation des CD45-Gens berichtet. Stanton et al. beschrieben eine Transversion der Basen Adenin und Guanin an Position 54 Exon A. Als Folge kodiert dieser Bereich für die Aminosäure Alanin statt Threonin. Diese A54G- Mutation findet sich gehäuft bei HIV- Infizierten in Uganda (Stanton et al. 2004), war jedoch ebenfalls nicht Bestandteil der vorliegenden Studie.

7.3 Homozygotie

Im Rahmen von PCR-RFLP-Analysen fällt auf, dass bei allen Individuen mit variantem CD45RA Expressionsmuster, sowohl in der Kontrollgruppe als auch im Patientenkollektiv, parallel Wildtypfragmente und mutationsspezifische Fragmente auftreten. Das bedeutet, dass bei allen identifizierten Individuen mit variantem Phänotyp, Heterozygotie bezüglich der Punktmutation an Position 77 des Exon A besteht. Dieses Ergebnis wird durch die derzeit bestehende Datenlage unterstützt. Bislang konnten in keiner vorliegenden Studie homozygote Merkmalsträger gefunden werden. Warum gelang dies bislang nicht?

Bereits die Wahrscheinlichkeit einen homozygoten Träger zu finden ist rein statistisch relativ gering. Der regulatorische Polymorphismus der CD45RA Expression tritt nur mit einer

Häufigkeit von ca. 1% in der kaukasischen Gesamtbevölkerung auf. In der vorliegenden Arbeit wurde in der gesunden Kontrollgruppe eine Allelfrequenz von 1,3% für die Mutation ermittelt. Wie in Tabelle 7.1 ersichtlich, stimmt dieses Ergebnis mit aktuellen Literaturdaten überein.

Tab. 7.1 Frequenz der C77 G Transversion im Exon A des CD45 Gens bei gesunden Probanden unterschiedlicher Populationen

Population	Allelfrequenz %	Quelle
Großbritannien (236,181)	0,85-3,5	Tchilian et al. 2002; Stanton et al. 2003
Schweden (1044)	1,4	Vorechovsky et al. 2001
Deutschland (303, 377)	0- 1,4	Jacobsen et al. 2000, Mitterski et al. 2002
Italien (222, 529)	0- 0,9	Ballerini et al. 2002, Gomez-Lira et al. 2003
Zentralasien (279, 139)	1,6- 2,1	Tchilian et al. 2002, Stanton et al. 2003
Pamir (75)	6,7	Tchilian et al, 2002
Süd-Ost-Asien (143)	0	Tchilian et al. 2002
Japan (175)	0	Stanton et al. 2003
Korea (48)	0	Stanton et al. 2003
USA (244)	1,8	Barcellos et al. 2001
Uganda (93, 209)	0	Tchilian et al. 2002, Stanton et al. 2003

Aufgrund dieser niedrigen Allelfrequenz müsste theoretisch ein wesentlich größeres Patientenkollektiv untersucht werden, um einen homozygoten Merkmalsträger zu identifizieren. Ob jedoch überhaupt homozygote Merkmalsträger existieren, ist fraglich, denn möglicherweise bedeutet Homozygotie bezüglich der untersuchten Punktmutation einen deutlichen Selektionsnachteil, wenn nicht einen Letalitätsfaktor. So ist bekannt, dass eine mangelnde Oberflächenexpression von CD45 zu schwersten Immundefekten (SCID) mit letalem Ausgang führt (Kung et al. , 2000). Bereits 1997 wurde von einem 2 Monate alten Säugling berichtet, der an einer Pneumonie mit hochfebrilen Temperaturen und rezidivierenden Lymphadenitiden litt (Cale et al. 1997). Laborchemisch imponierte eine Panzytopenie. Das Screening auf HIV-1 und HIV-2-Antikörper blieb negativ. Trotz antiviraler Behandlung und Knochenmarktransplantation

verstarb das Kind im Alter von 10 Monaten. Die Analyse der Lymphozytenpopulationen zeigte eine absolute Lymphozytopenie. Bei normaler Anzahl von B-Zellen, waren die T-Zellen im peripheren Blut deutlich vermindert. Am auffälligsten war jedoch, dass alle Lymphozyten auf ihrer Oberfläche nur sehr reduziert CD45 aufwiesen. Insbesondere die Isoformen RA und RB, sowie R0 wurden nur minimal exprimiert. Die Diagnose eines SCID (severe combined immunodeficiency)- Syndroms wurde gestellt. SCID beschreibt eine heterogene Gruppe erblicher Krankheiten, die zu einer Fehlfunktion von T- und B- Lymphozyten führen. Unter anderem resultieren daraus Veränderungen in der Antigenpräsentation, der Antigen-Rezeptor-Bindung, der Signal-Transduktionskette und der Wirkung unterschiedlicher Zytokine. Beim SCID- Syndrom sind sowohl X-chromosomale Mutationen der Zytokinrezeptoren (insbesondere für IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 und IL-15), als auch autosomal-rezessive Formen bekannt, durch die Janus-Kinasen inaktiviert werden. Tchilian et al. erkannten 2001, dass dieser stark verminderten Expression von CD45 eine homozygote 6-Bp-Deletion im CD45-Gen zugrunde liegt (Genlokus 1q31-32, Chromosom 11). Durch diese Mutation tritt ein Verlust von Glutamat 339 und Tyrosin 340 im ersten Fibronektin Typ III- Modul der extrazellulären Domäne von CD45 auf. Es gibt Hinweise, dass durch den Verlust von Tyrosin die strukturelle Integrität von CD45 aufgehoben wird, was zu einer mangelnden Expression dieses Glykoproteins führt. Diese Beobachtung geht mit den Ergebnissen einer weiteren Studie dieser Forschungsgruppe konform, in der das Auftreten schwerster Immundefekte bei CD45-defizienten Mäusen untersucht wurde. Tchilian et al. beobachteten bei diesen Mäusen eine gehemmte thymale T-Zell-Entwicklung, was eine deutliche Reduktion peripherer T-Lymphozyten zur Folge hatte. Obwohl bei diesen Mäusen die Entwicklung der B-Lymphozyten normal verlief, war ihre immunologische Antwort stark reduziert (Tchilian et al. 2001). Der Thymus ist das primäre lymphatische Organ, in dem die Entwicklung von hämatogenen Vorläuferzellen zu funktionellen Antigen-spezifischen T-Lymphozyten in physiologischer Weise erfolgen kann. Die als Thymozyten bezeichneten lymphatischen Vorläuferzellen durchlaufen unterschiedliche Entwicklungsstadien, die durch Oberflächenmarker und spezifische molekulare Eigenschaften definiert sind. Die für die Ausreifung notwendigen Stimuli werden hauptsächlich durch hämatopoetische und epitheliale Stromazellen gegeben, ohne die eine Bildung von T-Zellen ausbleibt. Durch die Interaktion zwischen sich entwickelnden Thymozyten und Stromazellen werden komplexe Vorgänge der positiven und negativen Selektion von Thymozyten eingeleitet. Dadurch wird sicher gestellt, dass reife T-Zellen Fremd-Antigene ausschließlich im Kontext mit eigenen MHC- Molekülen

erkennen und dass Immunantworten gegen Selbst- Antigene ausbleiben. Beim Menschen wird die Thymusanlage ab der sechsten Gestationswoche durch T-Lymphozyten-Vorläuferzellen der Leber und ab der 22. Gestationswoche durch Zellpopulationen aus dem Knochenmark besiedelt. Die hämatopoetischen Vorläuferzellen wandern durch Transmigration durch die Endothelzellen der Blutgefäße in die kortiko-medulläre Übergangszone, wo sie als unreife lymphoide Zellen mit ihrer linienspezifischen Ausreifung beginnen. Chemokine, Integrine und extrazelluläre Matrixproteine mit adhäsiven und deadhäsiven Eigenschaften sind für die gerichtete Migration der reifenden Thymozyten innerhalb und zwischen den unterschiedlichen Thymozytenkompartimenten verantwortlich. Parallel zu dieser Wanderung erfolgt auch die Ausdifferenzierung der Thymozyten über unterschiedliche Reifungsstadien zu physiologisch maturen und funktionell kompetenten T-Zellen. Für die Emigration von reifen T-Zellen aus dem Thymus scheinen erneut unterschiedliche Chemokine eine Rolle zu spielen. Nach Antigenstimulation tritt eine Aktivierung des adaptiven Immunsystems ein, was zu einer 10- bis 100fachen Expansion von T-Zellen führt, von denen einige zu einem späteren Zeitpunkt und bei erneutem Kontakt mit dem gleichen Antigen eine schnellere und effizientere Sekundärantwort vermitteln können. Eine solche anamnestic Funktion wird durch $CD4^+$ und $CD8^+$ - T-Gedächtniszellen übernommen. Die Gedächtniszellen besitzen die einmalige Fähigkeit, noch Jahre nach einer erfolgten Primärantwort bei einer entsprechenden Antigen-Reexposition eine qualitativ und quantitativ adäquate Immunantwort zu bilden. Die aus naiven T-Zellen differenzierten Effektorzellen besitzen eine relativ kurze Lebensspanne und werden meist nach Ablauf einer Immunantwort durch aktivierungsinduzierten Zelltod (AICD) eliminiert. Die wenigen während einer spezifischen Immunantwort gebildeten T-Gedächtniszellen (ca. 5% aller T-Effektorzellen) sind eine offensichtliche Ausnahme. Gegenwärtig ist aber nur ansatzweise bekannt, welche zellulären und molekularen Einflüsse darüber bestimmen, dass sich aus naiven T-Zellen infolge einer Aktivierung einerseits kurzlebige Effektorzellen und andererseits langlebige Gedächtniszellen differenzieren können.

Mit der Differenzierung von naiven T-Zellen zu Effektorzellen kommt es zu einer Änderung des Zell- Phänotyps. Wie bereits beschrieben, werden durch alternatives Spleißen der mRNA unterschiedliche CD45-Isoformen gebildet, die sich in Größe und Zusammensetzung der extrazellulären Molekülabschnitte unterscheiden. So kann der Nachweis spezifischer CD45-Isoformen den individuellen Aktivierungsstatus des T-Lymphozyten wiedergeben. Die CD45RA-Isoform ist typisch für naive T-Zellen, während infolge einer T- Zell- Aktivierung nach

Antigenexposition sowohl Effektorzellen, als auch Gedächtniszellen die CD45R0-Isoform (180 kDa) neu bilden und die Expression von CD45RA einstellen. CD45R0 und CD45RA werden deshalb als phänotypische Marker in der Diagnostik eingesetzt werden. CD45R0 entspricht einer Spleißvariante, die typischerweise auf Gedächtniszellen exprimiert wird. Daher wird diese Isoform oft als Marker für diesen Zelltyp verwendet. Die Stabilität des CD45R0- Phänotyps ist jedoch limitiert. So konnte im Tierversuch nachgewiesen werden, dass eine kleine Subpopulation von T-Gedächtniszellen die Expression von CD45RA beibehalten bzw. wieder rückgewinnen kann, ohne ihre Gedächtnisfunktion zu ändern. Eine homozygote Mutation an Position 77 des Exon A würde bedingen, dass trotz Aktivierung der T-Effektorzellen und T-Gedächtniszellen keinerlei Expression der Isoform 0 eintreten würde. Stattdessen würden alle T-Zellen die Isoform AB exprimieren. Dies würde ein zu einer fehlerhaften Aktivierung der T-Lymphozyten führen. Bei gesunden Individuen mit normaler CD45-Expression werden reife Thymozyten in die Peripherie entlassen und repräsentieren dann naive T-Zellen (CD45RA+/CD45R0-), die noch keinerlei Antigenkontakt gehabt haben. Nach Aktivierung durch ein Antigen weisen T-Lymphozyten und memory T-Zellen mit CD45RA-/CD45R0+ ein umgekehrtes CD45-Expressionsmuster auf (Akbar et al., 1988). Bei einem homozygoten Auftreten der untersuchten Punktmutation würden alle aktivierten T-Lymphozyten die Isoform CD45RA+ weiter exprimieren. Es ist durchaus denkbar, dass damit reife T-Zellen nicht lebensfähig wären und schwerste Immundefizienzsyndrome, ähnlich dem bereits beschriebenen SCID- Syndrom, entstehen könnten. Obwohl die genau funktionelle Bedeutung der einzelnen Isoformen unklar ist, wurde beobachtet, dass T-Zellen von Probanden mit 77 C G- Transversion, die verstärkt CD45RA-Isoformen exprimieren, eine gesteigerte Proliferationsrate und IL-2-Produktion nach Stimulation des T-Zellrezeptors aufweisen (Do et al., 2006). Die zytoplasmatische Domäne des Glykoproteins CD45 besitzt eine katalytische Funktion als Tyrosinphosphatase. Bei der T-Zell-Aktivierung wird CD45 in den Kontaktbereich zwischen T-Lymphozyt und Antigen-präsentierender Zelle gebracht und beteiligt sich dort an der funktionellen Ausbildung des signaltransduzierenden Komplexes im Bereich der immunologischen Synapse. Dabei dephosphoryliert CD45 die intrazellulären Kinasen Fyn und Lck, die bei der T-Zell-Aktivierung mit dem Antigenrezeptor, CD4 bzw. CD8 und CD2 einen gemeinsamen Komplex bilden. In Folge der Dephosphorylierung der beiden Kinasen kommt es über eine konformationelle Änderung zur Aktivierung ihrer katalytischen Funktion. Unterschiedliche Studien lassen darauf schließen, dass die Persistenz der hochmolekularen Isoform CD45RA zu einer höheren

Phosphataseaktivität von CD45, sowie zu einem gesteigerten Kalziumeinstrom in die T-Zelle führt, was eine prolongierte T-Zellaktivierung begünstigt. Außerdem wurde in mutierten T-Zelllinien ein erhöhter aktiver Pool der p56^{lck}- Tyrosinkinase gemessen. Eine prolongierte T-Zell-Aktivierung und gesteigerte Zytokinproduktion sind möglicherweise an der Entstehung verschiedener Autoimmunerkrankungen beteiligt, sodass die Daten darauf hin deuten, dass die Entwicklung einiger Autoimmunerkrankungen möglicherweise durch die C77G Punktmutation im Exon 4 des CD45-Gens begünstigt wird (Tchilian et al., 2001, Schwinzer et al., 2003; Vogel et al., 2003, Do et al., 2006).

7.4 Assoziation der varianten CD45RA Expression auf T-Lymphozyten mit verschiedenen Krankheitsbildern

Wie bereits geschildert ist die genaue Pathogenese der dilatativen Kardiomyopathie bislang nicht vollständig geklärt. Im Jahre 2000 rückte eine weitere Mutation ins Interesse zum Verständnis autoimmunologischer Erkrankungen. Eine Marburger Arbeitsgruppe um Jacobsen postulierte damals erstmalig einen Zusammenhang zwischen der C77G Transversion im Exon A des CD45 Gens und der Entstehung einer multiplen Sklerose. Wie auch bei der DCM werden in der Pathogenese der multiplen Sklerose (MS) genetische und autoimmunologische Faktoren diskutiert. Im Rahmen der Erkrankung treten Entmarkungsherde des zentralen Nervensystems auf. Bevorzugt sind diese im Bereich des Großhirnmarklagers, in den Sehnerven, im Kleinhirn und Rückenmark lokalisiert. Folge des Markscheidenzerfalls ist ein schubweiser Verlauf mit Sehstörungen, Ataxie, Dysarthrie, spastischer Lähmung und Inkontinenz. Die Marburger Arbeitsgruppe untersuchte 219 Patienten mit gesicherter multipler Sklerose. Bei 14 Patienten wurde die C77G Transversion mit einem resultierenden, varianten CD45RA Expressionsmuster gefunden. Auch Jacobsen et al. berichteten ausschließlich, wie auch die vorliegende Arbeit, über heterozygote Merkmalsträger. Mögliche Ursachen dafür wurden bereits erörtert. Nach Veröffentlichung dieser Daten entbrannte eine Diskussion über die Bedeutung dieser Mutation in der Entstehung verschiedenster Erkrankungen mit autoimmunologischem Hintergrund. In zahlreichen Studien wurden teilweise kontroverse Forschungsergebnisse erzielt. Auch hinsichtlich der Pathogenese der multiplen Sklerose ist die Datenlage nicht eindeutig. Mehrere Studien sehen, im Gegensatz zu der 2000 veröffentlichten Marburger Studie, keinen Zusammenhang zwischen einem varianten CD45 Expressionsmuster und der Entstehung der

multiplen Sklerose. So schlossen beispielsweise Misterski et al., dass die C77G Transversion im CD45 Gen nur in wenigen Familien zur Entstehung einer multiplen Sklerose beitragen würde, in der Mehrzahl der Fälle jedoch ohne pathogenetische Bedeutung sei. Eine signifikante Assoziation zum Geschlecht der Patienten, dem Ausprägungsgrad oder geographische Faktoren der Erkrankung oder ließ sich ebenfalls nicht herstellen. Letztlich sehen die Mehrzahl der bislang veröffentlichten Studien in Großbritannien, den USA, Deutschland und Italien keinen signifikanten Zusammenhang zwischen dem hier untersuchten CD45 Polymorphismus und der Pathogenese der multiplen Sklerose. Aufgrund der kontroversen Studienlage sind eventuell jedoch weitere Studien notwendig, um hier zu einer eindeutigen Aussage zu gelangen.

Obwohl die Datenlage Grund für zahlreiche Diskussionen über die Rolle der C77G Transversion in der Pathogenese der multiplen Sklerose bietet, untersuchen seit der Veröffentlichung der Daten durch die Marburger Arbeitsgruppe zahlreiche Forschungsgruppen eine mögliche Assoziation dieser Mutation mit verschiedensten Krankheitsbildern. 2003 veröffentlichten Vogel et al. Ergebnisse, die einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Punktmutation und der Entstehung der Autoimmunhepatitis (AIH) vermuten ließen. Diese Erkrankung ist häufig mit anderen Autoimmunkrankheiten (rheumatoide Arthritis, Glomerulonephritis, Colitis ulcerosa, Morbus Crohn und Hashimoto-Thyreoiditis) assoziiert. Neben allgemeinen Zeichen der Leberschädigung zeigen sich in über 50% der Fälle zusätzlich eine Vaskulitis, eine Kryoglobulinämie, sowie ein Sjögren-Syndrom. Pathogenetisch handelt es sich um eine Autoimmunreaktion gegen Lebergewebestrukturen, wobei die Rolle der einzelnen auftretenden Autoantikörper bislang noch nicht genau bekannt ist. Die Forschungsgruppe um Vogel untersuchte 178, an einer AIH erkrankten Patienten. Bei 12 Personen (Allelfrequenz 3,16%) ließ sich die C77G Transversion nachweisen. Die Patienten mit AIH und varianten CD45RA Expressionsmuster zeigten im Vergleich zu Patienten mit Wildtyp CD45 Expressionsmuster keine Unterschiede hinsichtlich des Schweregrades der Erkrankung, im Alter der Manifestation oder in der Ausbildung einer prognostisch ungünstigen Leberzirrhose. Auch wenn Vogel die Punktmutation nicht als Hauptrisikofaktor für die Entstehung einer AIH sieht, postuliert er doch die These, dass es sich bei CD45 um ein modifizierendes Gen der menschlichen Autoimmunität handeln könnte. Aufgrund der zentralen Bedeutung von CD45 bei der T-Zell-Rezeptor-vermittelten Signaltransduktion rückte das variante CD45 Expressionsmuster auch in das Blickfeld der Sklerodermieforschung. Die genaue Ätiologie dieser Erkrankung ist ebenfalls unbekannt. Formalpathogenetisch liegt eine übermäßige und abnorme Kollagenbiosynthese vor.

Für die Beteiligung eines Autoaggressionsprozesses spricht das Auftreten einer T-Zell-Sensibilisierung gegen Kollagen, sowie antinukleäre Antikörper gegen Zentromere (ANA) und Topoisomerase-I (AntiScl-70) bei einigen Patienten. 2003 veröffentlichte die Medizinische Hochschule Hannover Ergebnisse einer Studie, die eine Beteiligung der C77G Transversion des CD45 Gens an der Entstehung einer Sklerodermie nahelegen. Diese Ergebnisse ließen sich für weitere Erkrankungen (Systemischer Lupus erythematoses, Diabetes mellitus Typ I, rheumatoide Arthritis, Morbus Basedow, Myasthenia gravis, Colitis ulcerosa und Morbus Crohn) nicht reproduzieren. Es gibt jedoch Hinweise, dass die C77G Transversion bei Patienten mit HIV-1-Infektion gehäuft auftritt. Bei 197 untersuchten HIV-1- Patienten wiesen 11 (5,6%) das variante CD45 Expressionsmuster auf (Tchilian et al., 2001). Weiterhin wurden 2 Familien beschrieben, bei denen sich ein ähnlicher Spleißdefekt des CD45 Gens nachweisen ließ und in denen eine familiäre Häufung der Histiozytosis X beobachtet wurde.

Anhand dieser Studien lässt sich vermuten, dass CD45 mit seiner großen Bedeutung für die T-Zell-Rezeptor vermittelten Signaltransduktion vor allem als modifier-Gen eine Rolle in der Pathogenese unterschiedlichster autoimmun-vermittelter Erkrankungen spielt und dass die Entstehungsmechanismen dieser Erkrankungen wahrscheinlich vielschichtig (genetisch, autoimmunologisch und viral) sind.

7.5 Die DCM – ein multifaktorielles Krankheitsbild

Herzmuskelerkrankungen umfassen sehr heterogene Krankheitsbilder, wobei das Spektrum von asymptomatischen, nur zufällig diagnostizierten bis hin zu dramatischen und zum Teil lebensbedrohlichen Veränderungen, sowie von akut einsetzenden bis jahrzehntelangen chronischen Verläufen reicht. Die Prognose dieser Krankheiten ist sehr variabel; manche heilen völlig folgenlos aus, während andere eine dauerhafte ernsthafte Beeinträchtigung der Lebensqualität nach sich ziehen. Dennoch wird angenommen, dass es gemeinsame Pathomechanismen für diese unterschiedlich erscheinenden Erkrankungen gibt. Dabei wird unter anderem der myokardialen Entzündungen (die oft viral ausgelöst wird) eine bedeutende Rolle zugewiesen, insofern, dass eine solche Entzündung manchmal nach Beseitigung der Ursache nicht ausheilt, sondern chronifiziert und auf diese Weise eine zunehmende Schädigung des Myokards bewirkt. Die Präsentation von Virusproteinen aktiviert das Immunsystem primär gegen virale Antigene, bei genetisch prädisponierten Personen aber auch gegen myokardiale Antigene

über molekulare Mimikry (Gauntt et al., 1993). Aktivierte B-Lymphozyten produzieren dann nicht nur gegen virale, sondern auch gegen Myokardantigene kreuzreagierende Antikörper, die ebenfalls zur Kontraktilitätseinschränkung führen. Große Metaanalysen (D'Ambrosio, 2001) beschreiben, dass bei ca. 20% der Patienten mit histologisch gesicherter Myokarditis innerhalb weniger Jahre eine DCM entsteht. Umgekehrt lassen sich bei vielen Patienten mit DCM entzündliche Myokardveränderungen nachweisen. Nun beruhen diese Studien jedoch alle auf einem histologischen Nachweis der Myokarditis nach den Dallas-Kriterien (Aretz, 1987). Diese sind aber wegen ihrer geringen Sensitivität in der Detektion, insbesondere einer chronischen Entzündung, umstritten.

Tab. 7.2 Dallas-Klassifikation der dilatativen Kardiomyopathie

I.	Biopsie
	Myokarditis mit/ohne Fibrose
	Grenzwertige Myokarditis (erneute Biopsie indiziert)
	Keine Myokarditis
II.	Folgebiopsien
	persistierende Myokarditis mit /ohne Fibrose
	ausheilende Myokarditis mit /ohne Fibrose
	abgeheilte Myokarditis mit /ohne Fibrose
III.	Histopathologie
	inflammatorisches Infiltrat, klassifiziert als eosinophil, lymphozytär, neutrophil,
	Riesenzell-Infiltrat, granulomatöses gemischtes Infiltrat

Als bessere diagnostische Instrumente haben sich in den letzten Jahren der myokardiale Virusnachweis und die immunhistologische Aufarbeitung von Myokardbiopsien etabliert, die es aufgrund der Spezifität monoklonaler Antikörper erlauben, infiltrierende Entzündungszellen quantitativ und qualitativ zu erfassen. Es gibt jedoch kaum Vergleiche der histologischen mit immunhistologischen Ergebnissen an einer größeren Patientenzahl. Außerdem liegen auch kaum Verlaufsuntersuchungen vor, die eindeutig die Rolle einer chronischen Herzmuskelentzündung in Hinblick auf eine progrediente oder persistierende Myokardschädigung gezeigt haben. Weiterhin gibt es aktuell keine eindeutigen Erkenntnisse darüber, bei welchen Patienten sich mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit eine chronische Herzmuskelschwäche entwickeln wird. Bekannt ist

jedoch, dass lediglich ein Teil der Myokarditiden in der Entstehung einer dilatativen Kardiomyopathie mündet. Bei einem Teil (laut Literatur ca. 20-30% aller DCM-Patienten) der Patienten muss als Ursache einer eingeschränkten Pumpfunktion eine familiäre / genetische Störung vermutet werden; mittlerweile lassen sich viele verschiedene Gendefekte nachweisen, die mit einer progredienten Einschränkung der LV-Funktion assoziiert sind. Tabelle 7.3 gibt einen kurzen Überblick über die bislang bekannten, autosomal dominant vererbten Gendefekte.

Tabelle 7.3 Genloci der autosomal dominanten Form der DCM und den dazugehörigen Proteinen

<i>Chromosomale Lokalisation</i>	<i>Gen</i>	<i>Protein</i>
„Isolierte“ DCM		
1q32	TNNT2	Kardiales Troponin T
2q31	TTN	Titin
2q35	DES	Desmin
5q33	SGCD	δ-Sarcoglycan
6q12-q16	?	?
9q13-q22	?	?
9q22-q31	?	?
10q22-q23	VCL	Metavinculin
14q12	MYH7	β-Myosin heavy chain
15q14	ACTC	Kardiales Aktin
15q22	TPM1	α-Tropomyosin
DCM + Störungen Erregungsbildung und –leitung		
1p1-q21	LMNA	Lamin A und C
2q14-q22	?	?
3p22-p25	?	?
10q25-q26 (neu)	?	?
DCM + Skelettmypathie mit und ohne Erregungsbildungs- und -leitungsstörungen		
1p1-q21	LMNA	Lamin A und C
6q23	?	?
DCM + Sensorineuralem Hörverlust		
6q23-q24	?	?

Diese Gendefekte wurden hier nicht untersucht, jedoch ist es wahrscheinlich, dass ein Teil unsere Patienten mit DCM und persistierender oder progredienter LV-Dysfunktion einen derartigen

Gendefekt hat. Neben viralen und genetischen Faktoren scheinen autoimmunologische Aspekte eine Rolle in der Pathogenese der idiopathischen DCM zu spielen. Nicht nur der mögliche Übergang einer viralen Myokarditis in eine DCM spricht dafür. Heute sind verschiedene Autoantikörper der IgG-Klasse gegen unterschiedliche kardiale Strukturen bekannt. Beispielsweise seien Antikörper gegen Myolemm (AMLA), mitochondriale Proteine, kontraktile Eiweiße (Aktin, Myosin und Tropomysin), sowie Ionenkanäle (Kalziumkanal und ADP/ATP-Carrier) genannt. Positiv chronotrope β 1-adrenerge Antikörper lassen sich bei etwa 70% der Patienten nachweisen, negativ chronotrope Antikörper gegen den muskarinergen Acetylcholinrezeptor M2 finden sich bei 36-50% der DCM-Patienten (Wallukat, 2000). Die Bedeutung dieser Antikörper ist derzeit nicht vollständig aufgeklärt. Bekannt ist jedoch, dass eine immunsuppressive Therapie bei Patienten ohne Virusnachweis oft zum Behandlungserfolg und einer Verbesserung der kardialen Auswurf Funktion führt. Prospektive Familienstudien weisen darauf hin, dass in 60% der Fälle mit familiärer Häufung der idiopathischen DCM herzmuskelspezifische Antikörper nachgewiesen werden können. Diese scheinen auch eine gewisse Vorhersagekraft für das Auftreten der DCM zu besitzen. Oftmals lassen sich diese Autoantikörper Jahre, bevor diese Erkrankung klinisch manifest wird, im Serum der später Betroffenen nachweisen.

7.5.1 Assoziation der varianten CD45RA Expression auf T-Lymphozyten mit dem Krankheitsbild der idiopathischen DCM

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurde bei 104 Patienten mit gesicherter idiopathischer DCM untersucht, inwieweit eine Korrelation zwischen dieser Erkrankung und einer varianten CD45RA-Expression auf T-Lymphozyten besteht. Es fand sich kein signifikanter Unterschied in der Allelfrequenz der C77G Punktmutation zwischen dem Patientenkollektiv (2,4%) und gesunden Individuen (1,3%). Bedeutet dies, dass autoimmunologische Prozesse doch eine eher untergeordnete Rolle in der Entwicklung einer idiopathischen DCM spielen? Diese Frage lässt sich verneinen. Wie bereits berichtet, sind nach aktueller Studienlage zahlreiche Autoantikörper gegen kardiale Proteine bekannt. Außerdem exprimieren Individuen mit dieser Punktmutation verstärkt CD45RA auf der Oberfläche aktivierter Effektor- und Memory-T-Lymphozyten. Dieses führt zu einer forcierten Aktivierung der Leukozyten-spezifischen Protein-Tyrosin-Kinase (Lck). Dabei handelt es sich um ein Enzym, das sich im Zytoplasma von T-Lymphozyten befindet. Über

die Phosphorylierung der ζ -Ketten des T-Zell-Rezeptor-Komplexes und vermehrte Mobilisierung intrazellulärer Calcium-Ionen, ist Lck an der T-Zell-Rezeptor vermittelten Signaltransduktion der T-Lymphozyten entscheidend beteiligt. Auch durch vermehrte Produktion von Zytokinen, wie z.B. Interleukin-2, resultiert eine verstärkte Immunantwort der aktivierten T-Lymphozyten (Dawes et al., 2006). 2007 wurden Daten veröffentlicht die belegen, dass T-Lymphozyten von Individuen mit der C77G Transversion eine verstärkte Sensitivität gegenüber Zytokinen besitzen (Windhagen et al., 2007). Nach Stimulierung mit Interleukin-2 proliferieren T-Lymphozyten der Mutationsträger wesentlich schneller als die der Wildtyp-Probanden. Weiterhin scheinen die Adhäsionseigenschaften der T-Lymphozyten verstärkt zu sein. Die Janus-Kinase-1 (JAK-1) wird stark beschleunigt phosphoryliert. Es handelt sich dabei um eine zytoplasmatische Tyrosinkinase, welche z.B. in Verbindung mit Zytokin-Rezeptoren vorkommt. Die Rezeptoren besitzen keine eigene Enzymaktivität und benötigen daher die Kinasen JAK-1 und JAK-2, die nach Stimulierung der Zytokin-Rezeptoren über spezifische Zytokin-Moleküle aktiviert werden. Nach gegenseitiger Phosphorylierung der JAKs liegen die Janus-Kinasen im aktivierten Zustand vor und phosphorylieren nun STAT-Proteine (signal transducer and activator of transcription), die sich anschließend zum Zellkern bewegen, um dort die Transkription spezifischer Zielgene zu stimulieren. Über die JAK und STAT Proteine vermitteln zahlreiche Zytokine, Interferone, Interleukine; aber auch Erythropoetin, das Wachstumshormon (GH), Prolaktin und Leptin ihr Signale. Daher liegt nahe, dass es durch die C77G Transversion im Exon A des CD45 Gens zu einer verstärkten Immunantwort der T-Lymphozyten auf spezifische Antigene, wie z.B. Virenbestandteile, kommt. Die Entstehung einer idiopathischen DCM könnte somit begünstigt werden.

Die fehlende Assoziation zwischen dem C77G Polymorphismus des CD45 Gens und dem Auftreten einer idiopathischen DCM könnte auch in einer zu geringen Anzahl von untersuchten gesunden Probanden und erkrankten Patienten begründet sein. Mehrere Studien beschreiben bei gesunden Individuen eine Allelfrequenz in Deutschland von 0 bis 1,4% für diese Mutation (Jacobsen et al., 2002, Mitterski et al., 2002). Da im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine Allelfrequenz von 1,3% ermittelt wurde, stimmen diese Daten jedoch mit der aktuellen Studienlage überein. Daher ist eine zu geringe Größe der untersuchten Kollektive eher unwahrscheinlich. Weiterhin werden, wie bereits geschildert, regionale Unterschiede im Auftreten der C77G Transversion beschrieben. Mit einer relativ niedrigen Frequenz tritt diese Mutation in Europa, Nordamerika und Asien auf (zwischen 0 und 2,3%), in Uganda, Korea und

Japan fehlt sie völlig (Tchilian et al., 2002). Interessanterweise findet sich die Varianz mit einer höheren Frequenz in Großbritannien (3,5%) und im Pamir (6,7%).

Resultat der vorliegenden Studie ist, dass die Allelfrequenz der Mutation bei an einer idiopathischen DCM leidenden Patienten zwar erhöht ist (2,4% bei Patienten vs. 1,3% bei gesunden Individuen), im Vergleich zu dem gesunden Kontrollkollektiv jedoch keine signifikante Erhöhung besteht ($p=0,327$). Dennoch könnten die vorliegenden Daten eine Tendenz zeigen, die es in weiteren Studien zu überprüfen gilt. Neben einer größeren Anzahl von Patienten wäre eine strengere Auswahl der Selektionskriterien zu überdenken. So wäre es interessant zu prüfen, inwiefern die C77G Transversion im Exon A des CD45 Gens in Verbindung mit weiteren autoimmunologischen Faktoren (z.B. Autoantikörper gegen kardiale Strukturen), zur Entstehung einer idiopathischen DCM beiträgt. Spezifische Autoantikörper oder HLA-Antigene sind in der vorliegenden Arbeit nicht berücksichtigt, sodass eine Unterteilung der idiopathischen DCM in verschiedene Subtypen nicht getroffen werden kann.

Letztlich ist der hier untersuchte Polymorphismus der CD45RA Expression als alleinige Ursache für die Entstehung einer DCM unwahrscheinlich. Als Co-Faktor könnte er jedoch, neben weiteren Pathogenen wie Alkohol oder Virusinfekten, an der Entstehung dieser Erkrankung beteiligt sein. Eine verstärkte Immunantwort wurde bei Probanden mit dieser Mutation mehrfach nachgewiesen (Schwinzer et al., 2007, Dawes et al., 2006). Daher sollten bei der Suche nach Assoziationen zwischen der Punktmutation und dem Krankheitsbild der DCM neben den bereits genannten Autoantikörpern auch Noxen wie Alkohol, oder der Nachweis von Virusgenomen als Zeichen einer stattgehabten viralen Myokarditis berücksichtigt werden.

8. Literatur

- AHMAD, F., SEIDMAN, JG., SEIDMAN, CE. (2004)
The genetic basis for cardiac remodeling
Am. Heart J., **147** (5), 919-23
- AKBAR, A. N., TERRY, L., TIMMIS, A., BEVERLEY, P.C.L., JANOSSAY, G. (1988).
Loss of CD45R and gain of UCHL1 reactivity is a feature of primed T cells.
J. Immunol. **140**, 2171
- ARDIZZONE, N., CAPPELLO, F., DI FELICE, V., RAPPÀ, F., MINERVINI, F., MARASA, S., MARASA, L., RABL, W., ZUMMO, G., SERGI, C. (2007)
Atrial natriuretic peptide and CD34 overexpression in human idiopathic dilated cardiomyopathies
APMIS, **115** (11), 1227-33
- BABA, A., YOSHIKAWA, T., MITAMURA, H., AKAISHI, M., OGAWA, S. (2002).
Autoantibodies against sarcolemmal Na-K-ATPase in patients with dilated cardiomyopathy: Autoimmune basis for ventricular arrhythmias in patients with congestive heart failure.
J. Cardiol. **39**, 47-58
- BADORF, C., LEE, G.H., LAMPHEAR, B.J., MARTONE, M.E., CAMPBELL, K.P. (1999)
Enteroviral protease 2A cleaves dystrophin: evidence of cytoskeletal disruption in an acquired cardiomyopathy.
Nat. Med. **5**, 320-326
- BALLERINI, C., ROSATI, E., SALVETTI, M., RISTORI, G., CANNONI, S., BIAGIOLI, T. (2002)
Protein tyrosine phosphatase receptor- type C exon 4 gene mutation distribution in an Italian multiple sclerosis population.
Neurosci Lett. **328**, 325-27
- BARCELLOS, L.F., CAILLIER, S., DRAGONE, L., ELDER, M., VITTINGHOFF, E., BUCHER, P., LINCOLN, R.R., PERICAK-VANCE, M., HAINES, J.L., WEISS, A., HAUSER, S.L., OKSENBERG, J.R. (2001).
PTPRC (CD45) is not associated with the development of multiple sclerosis in U.S. patients.
Nature genetics **29**, 23-24
- BELL, M.G., DETHLOFF, M.G., IMBODEN, J.B. (1993).
CD45-negative mutants of a rat natural killer cell line fail to lyse tumor target cells.
J. Immunol. **151**, 3646

- BINAH, O. (2002).
Cytotoxic lymphocytes and cardiac electrophysiology.
J. Mol. Cell Cardiol. **34**, 1147-1161
- BINAH, O. (2000)
Immune effector mechanisms in myocardial pathologies (Review).
Int. J. Mol. Med. **6**, 3-16
- BONNE, G., MERCURI, E., MUCHIR, A. (2000)
Clinical and molecular genetic spectrum of autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy due to mutations of the lamin A/C gene.
Ann Neurol. **48**, 170-180
- BOWLES, K.L., GAJARSKI, R., PORTER, P. (1996).
Gene mapping of familial autosomal dominant dilated cardiomyopathy to chromosome 10q 21-23.
J. Clin. Invest. **98**, 1355-1360
- BOWLES, N.E., RICHARDSON, P.J., OLSEN, E.G., ARCHARD, L.C. (1986).
Detection of Coxsackie-B-virus-specific RNA-sequences in myocardial biopsy samples from patients with myocarditis and dilated cardiomyopathy.
Lancet **1**, 1120-1123
- CAFORIO, A.L.P., MAHON, N.J., TONA, F, McKENNA, W.J. (2001).
Circulation cardiac autoantibodies in dilated cardiomyopathy and myocarditis: pathogenetic and clinical significance.
Eur. J. Heart Failure **12** ,165-167
- CAFORIO, A.L.P., TONA, F., BOTTARO, S., VINCI, A., DEQUAL, G., DALIENTO, L., THIENE, G., ILICETO, S. (2008)
Clinical implications of anti-heart autoantibodies in myocarditis and dilated Cardiomyopathy
Autoimmunity **41** (1), 35-45
- CAFORIO, A.L.P., JONATHAN, H.G., BAIG, M.K., MAHON, N.J., HAVEN, A.J., SOUBERBIELLE, B.E., HOLT, D.W., DALGLEISH, A.G., McKENNA, W.J. (2001).
Elevated serum levels of soluble interleukin-2-receptor, neopterin and β -2-microglobulin in idiopathic dilated cardiomyopathy relation to disease severity and autoimmune pathogenesis.
Eur. J. Heart Failure **3**, 155-163
- CALE, C.M., KLEIN, N., NOVELLI, V., VEYS, P., JONES, A. M., MORGAN, G. (1997).
Severe combined immunodeficiency with abnormalities in expression of the common leucocyte antigen CD45.
Disease in Childhood **76**, 163-164

- CHARBONNEAU, H., TONKS, N.K., WALSH, K.A., FISCHER, E.H. (1988).
The leukocyte common antigen (CD45): A putative receptore-linked protein tyrosine phosphatase.
Proc. Natl. Acad. Sci. **85**, 7182
- CHRIST, T., WETTWER, E., DOBREV, D., ADOLPH, E., KNAUT, M., WALLUKAT, G., RAVENS, U. (2001).
Autoantibodies against the β 1-adrenoceptor from patients with dilated cardiomyopathy prolong action potential duration and enhance contractility in isolated cardiomyocytes.
J. Mol. Cell., Cardiol. **33**, 1515-1525
- COCCO, E., MURRU, M.R., MELIS, C., SCHIRRU, L., SOLLA, E., LAI, M., ROLESU, M., MARROSU, M.G. (2004).
PTPRC (CD45) mutation does not contribute to multiple sclerosis susceptibility in Sardinian patients.
J. Neurol. **251**, 1085-1088
- CYSTER, J.G., HEALY, J.I., KISHIKARA, K., MAK, T.W., THOMAS, M.L., GOODNOW, C.C. (1996)
Regulation of B-lymphocyte negative and positive selection by tyrosine phosphatase CD45.
Nature **381**, 325-328
- DAM, G.B., ZILCH, C.F., WALLACE, D., WIERINGA, B., BEVERLEY, P.C.L. (2000)
Regulation of Alternative Splicing of CD45 by Antagonistic Effects of SR Protein Splicing Factors.
J. Immunol. 5287-5295
- D'AMBROSIO, A., PATTI, G., MANZOLI, A., SINAGRA, G., DILENARDA, A., SILVESTRI, F., DI SCIASCIO, G. (2001)
The fate of acute myocarditis between spontaneous improvement and evolution to dilated cardiomyopathy, a review.
Heart **85** (5), 499-504
- DAWES, R., HENNIG, B., IRVING, W., PETROVA, S., BOXALL, S., WARD, V., WALLACE, D., MACALLAN, D., THURSZ, M., HILL, A., BODMER, W., BEVERLEY, P., TCHILIAN, E. (2006)
Altered CD45 expression in C77G carriers influences immune function and outcome of hepatitis C infection.
J. Med. Genet. **10**
- DURAND, J.B., ABCHEE, A.B., ROBERTS, R. (1995)
Molecular and clinical aspects of inherited cardiomyopathies.
Ann Med. **27**, 311-317

- DURAND, J.B., BACHINSKI, L.L., BIELING, L.C. (1995)
Localization of a gene responsible for familial dilated cardiomyopathy to chromosome 1q32.
Circulation **92**, 3387-3389
- DO, H.-T., BAARS, W., BORNS, K., WINDHAGEN, A.; SCHWINZER, R. (2006)
The 77C → G Mutation in the Human CD45 (PTPRC) Gene Leads to Increased Intensity in T Cell Lines from Healthy Individuals and Patients with Multiple Sclerosis
J. Immunol. **176**, 931-938
- ESTEGHAMAT, F., NOORINAYER, B., SANATI, MH., HEKMATDOOST, A., ZAFARGHANDI, M., SHALMANI, HM., AGAH, M., ZALI, MR. (2005)
C77G mutation in protein tyrosine phosphatase CD45 gene and autoimmune hepatitis
Hepatol. Res. **14**
- FATKIN, D., McRAE, C., SASAKI, T. (1999)
Missense mutations in the rod domain of the lamin A/C gene as causes of dilated cardiomyopathy and conduction-system disease.
N. Engl. J. Med. **341**, 1715-1724
- FERLINI, A., MUNTONI, F. (1998)
The 5' region of intron 11 of the dystrophin gene contains target sequences for mobile elements and three overlapping ORFs.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **242**, 401-406
- FUJII, Y., OKUMURA, M., INADA, K., NAKAHARA, K. (1992°)
Reversal of CD45 isoforms switching in CD8⁺ T cells
Cellular Immunol., **139**, 176
- FUJII, Y., OKUMURA, M., INADA, K., NAKAHARA, K., MATSUDA, H. (1992b)
CD45 isoform expression during T cell development in the thymus.
Eur. J. Immunol., **22**, 1843
- FUKUHARA, K., OKUMURA, M., SHIONO, H., INOUE M., KADOTA, Y. (2002)
A study on CD45 isoform expression during T-cell development and selection events in the human thymus.
Hum. Immunol. **63**, 394-404
- GOLDFARB, L.G., PARK, K.Y., CERVENACOVA, L. (1998)
Missense mutations in desmin associated with familial cardiac and skeletal myopathy.
Nat. Genet. **19**, 402-403
- HARCOMBE, A.A., SHARPLES, L., LARGE, S.R., WALWORK, J., WEISSBERG, P.L. JOYSEY, V. (1999)
HLA antigene frequencies in end-stage idiopathic and ischaemic cardiomyopathy.
Int. J. Cardiol. **68**, 31-37

- HENGSTENBERG, C. (2003)
Die dilatative und die hypertrophische Kardiomyopathie- Molekulargenetische Fortschritte und klinische Perspektiven.
Cardiovasc **3/02**, 28-32
- HERMISTON, M.L., XU, Z., WEISS, A. (2000)
CD45: A Critical Regulator of Signaling Thresholds in Immune Cells.
Annu. Rev. Immunol. **21**, 107-137
- HEYD, F., DAM, G.T. ; MÖRÖY, T. (2006)
Auxiliary splice factor U2AF26 und transcribing factor Gfi1 Cooperate directly in Regulating CD45 alternative splicing.
Nature Immunology, **online publication**, Jul. 2006
- HOLMES, N. (2005)
CD45: all is not yet crystal clear.
Immunology **117**, 145-155
- IWATA, M., YOSHIKAWA, T., BABA, A., ANZAI, T., MITAMURA, H., SATOSHI, O. (2001)
Autoantibodies against the second extracellular loop of β 1-adrenergic receptors predict ventricular tachycardia and sudden death in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy.
J. Am. Coll. Cardiol. **37 (2)**, 418-424
- JACOBSEN, M., SCHWEER, D., ZIEGLER, A., GABER, R., SCHOCK, S., SCHWINZER, R., WONIGEIT, K., LINDERT, R.B., KANTARCI, O., SCHAEFER-KLEIN, J., SCHIPPER, H.I., OERTEL, W.H., HEIDENREICH, W. (2000)
A point mutation in PTPRC is associated with the development of multiple sclerosis.
Nat. Gen. **26**, 495-499
- JACOBSEN, M., HOFFMANN, S., CEPOK A., STEI, S. ZIEGLER, A., SOMMER N., HEMMER, B. (2002)
A novel mutation in PTPRC interferes with splicing and alters structure of the human CD45 molecule.
Immunogenetics **54**: 158-163
- JAHNS, R., BOIVIN, V., KRAPF, T., WALLUKAT, G., BOEGE, F., LOHSE, M.J. (2000)
Modulation of beta 1- adrenoceptor activity by domain- specific antibodies and heart failure-associated autoantibodies.
J. Am. Coll. Cardiol. **36 (4)**, 1280-1287
- JAHNS, R., BOIVIN, V., SIEGMUND, C., INSELMANN, G., LOHSE, M.J., BOEGE, F., (1999)
Autoantibodies activating human beta 1-adrenergic receptors are associated with reduced cardiac function in chronic heart failure.
Circulation **99**, 649-654

- JUNG, M., POEPPING, J., PERROT, A. (1999)
Investigation of family with autosomal dominant dilated cardiomyopathy defines a novel locus on chromosome 2q14-q22.
Am. J. Hum. Genet. **65**, 1068-1077
- JOHNSON, K.G., BROMLEY, S.K., DUSTIN, M.L., THOMAS, M.L. (2000)
A supramolecular basis for CD45 tyrosine phosphatase regulation in sustained T cell activation
PNAS, **97** (18), 10138-10143
- KASS, S., MacRAE, C., GRABER, H.L. (1994)
A gene defect that causes conduction system disease and dilated cardiomyopathy maps to chromosome 1p1-1q1.
Nat. Genet. **7**, 546-551
- KATAGIRI, M., OGIMOTO, M., HASEGAWA, K., ARIMURA, Y., MITOMO, K. (1999)
CD45 negatively regulates lyn activity by dephosphorylating both positive and negative regulatory tyrosine residues in immature B cells.
J. Immunol. **163**, 1321-1326
- KAYA, Z., AFNAEYEVA, M., WANG, Y., DOHMEN, K.M., SCHLICHTING, J., TRETTER, T., FAIRWEATHER, D., HOLERS, V.M., ROSE, N.R. (2001)
Contribution of the innate immune system to autoimmune myocarditis: a role for complement.
Nat. Immunol. **2** (8), 739-745
- KEELING, P.J., GANG, Y., SMITH, G., SEO, H., BENT, S.E., MURDAY, V. (1995)
Familial dilated cardiomyopathy in the United Kingdom.
Br. Heart J. **73**, 417-421
- KEELING, P.J., McKENNY, W.J. (1994)
Clinical genetics of dilated cardiomyopathy.
Herz **19**, 91-96
- KELLER, D.I., CARRIER, L. (2002)
Genetics of familial cardiomyopathies and arrhythmias.
Swiss Med. WKLY **20**, 93-102
- KISHIHARA, K., PENNINGER, J., WALLACE, V.A., KUNDING, T.M., KAWAI, K., WAKEHAM, A., TIMMS, E., PFEFFER, K., OHASHI, P.S., THOMAS, M.L. (2002)
Normal development of B-lymphocytes, but impaired development of T-cell maturation in CD45-exon 6 protein tyrosine phosphatase-deficient mice.
Cell **74**, 143-156

- KLINGEL, K., STEPHAN, S., SAUTER, M., ZELL, R., McMANUS, B.M., BULTMANN, B., KANDOLF, R. (1996)
Pathogenesis of murine enterovirus myocarditis: virus dissemination and immune cell targets.
J. Virol. **70**(12), 8888-8895
- KORETZKY, G.A., PICUS, J., THOMAS, M.L., WEISS, A. (1990)
Tyrosine phosphatase CD45 is essential for coupling T-cell antigen receptor to the phosphatidylinositol pathway.
Nature **346**, 66
- KRAJINOVIC, M., PINAMONTI, B., SINAGRA, G. (1995)
Linkage of familial dilated cardiomyopathy of chromosome 9.
Am. J. Hum. Genet. **57**, 846-852
- KRAJINOVIC, M., MESTRONI, L., SEVERINI, G.M. (1994)
Absence of linkage between idiopathic dilated cardiomyopathy and candidate genes involved in the immune function in a large Italian pedigree
J. Med. Genet. **31** 766-771
- KU, L., FEIGER, J., TAYLOR, M., MESTRONI, L. (2003)
Familial dilated cardiomyopathy.
Circulation, **108**, e118-e121
- KUNG, C., PINGEL, J.T., HEIKINHEIMO, M., KLEMOLA, T., VARKILA, K. (2000)
A study on CD45 isoform expression during T-cell development and selection events in the human thymus.
Hum. Immunol. **63**, 394-404
- LAUER, B.; PADDBERG, K.; SCHULTHEISS, H.P.; STRAUER, B.E. (1995)
Autoantibodies against cardiac myosin in patients with myocarditis and dilated cardiomyopathy
Cardiology. **84** (4), 301-10
- LAVIGUEUR, A., LA BRANCHE, H., KORNBLIHTT, A.R., CHABOT, B. (1993)
A splicing enhancer in human fibronectin alternate ED1 exon interacts with SR proteins and stimulates U2 snRNP binding.
Genes Dev., **7**, 2405
- LI, D., TAPSCOTT, T., GONZALEZ, O. (1999)
Desmin mutation responsible for idiopathic dilated cardiomyopathy.
Circulation **100**, 461-464
- LIU, P.P., MASON, J.W. (2001)
Advances in the understanding of myocarditis.
Circulation **104** (9), 1076-1082

- LUPPI, P., LICATA, A., HLUSZCZAK, C., RUDERT, W.A., TRUCCO, G., MCGOWAN, F., FINEGOLD, D., BOYLE, G.J., TRUCCO, M. (2001)
Analysis of TCR V β repertoire and cytokine gene expression in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy.
J. Autoimmunity **16** (1), 3-13
- LYNCH, K.W., WEISS, A. (2001)
A CD45 polymorphism associated with multiple sclerosis disrupts an exonic splicing silencer.
J. Biol. Chemistry Vol 276, **26**, 24341-24347
- MAISCH, B. (1987)
The sarcolemma as antigen in the secondary immunopathogenesis of myocarditis.
Eur. Heart J. , **8**, 155-165
- MAISCH, B. (1998)
Einteilung der Kardiomyopathien nach der WHO / ISFC Task Force- mehr Fragen als Antworten?
Med. Klinik, **93** (4), 199-209
- MAISCH, B., PORTIG, J., RISTIC, A., HUFNAGEL, G., PANKUWEIT, S. (2000)
Definition of inflammatory cardiomyopathy (myocarditis): un the way to consensus.
Herz, **25** (3), 200-209
- MARCELIS, C. (2001)
Dilated cardiomyopathy in cardiovascular genetics of clinicians.
Kluwer Acad. Publ., p-155-167
- MASON, J.W. (2003)
Myocarditis and dilated cardiomyopathy: an inflammatory link.
Cardiovasc. Research, **60**, 5-10
- MATSUMORI A., YAMADA, T., SUZUKI, H. (1994)
Increased circulating cytokines in patients with myocarditis and cardiomyopathy.
Brit. Heart J., **72**, 561-566
- McFARLAND, E.D.C., HURLEY, T.R., PINGEL, J.T., SEFTON, B.M., SHAW, A., THOMAS, M.L. (1993)
Correlation between Src family member regulation by the protein-tyrosine-phosphatase CD45 and transmembrane signalling through the T-cell receptor.
Proc. Natl. Acad. Sci. **90**, 1402
- MELACINI, P., FANIN, M., DUGGAN, D.J. (1999)
Heart involvement in muscular dystrophies due to sarcoglycan gene mutations.
Muscle Nerve, **22**, 473-479

- MESSINA, D.N., SPEER, M.C., PERICAK-VANCE, M.A., McNALLY, E.M. (1997)
Linkage of familial dilated cardiomyopathy with conduction defect and muscular dystrophy to chromosome 6q23.
Am. J. Hum. Genet., **61**, 909-917
- MESTRONI, L., MAISCH, B., McKENNA, W.J. (1999)
Guidelines for the study of familial dilated cardiomyopathy.
Eur. Heart J., **20**, 93-102
- MESTRONI, L., MIANI, D., DiLENARDA, A. (1990)
Clinical and pathologic study of familial dilated cardiomyopathy.
Am. J. Cardiol., **65**, 1449-1453
- MESTRONI, L., ROCCO, C., GREGORI, D. (1999)
Familial dilated cardiomyopathy: evidence for genetic and phenotypic heterogeneity.
J. Am. Coll. Cardiol., **34**, 181-190
- MICHELS, V.V., MOLL, P.P., MILLER, S.A. (1992)
The frequency of familial dilated cardiomyopathy in a series of patients with idiopathic dilated cardiomyopathy.
N. Engl. J. Med., **326**, 77-82
- MITERSKI, B., DRYNDA, S., BÖSCHOW, G., KLEIN, W., OPPERMANN, J., KEKOW, J., EPPLEN, J.T. (2004)
Complex genetic predisposition in adult and juvenile rheumatoid arthritis.
BMC Genetics, **5**, 1-14
- MITERSKI, B., SINDERN, E., HAUPTS, M., SCHIMRIGK, S., EPPLEN, J.T. (2002)
PTPRC (CD45) is not associated with multiple sclerosis in a large cohort of German patients.
BMC Genetics, **3**, 3
- MOGENSEN, J., KLAUSEN, J.C., PEDERSEN, A.K. (1999)
Alpha-cardiac actin is a novel disease gene in familial hypertrophic cardiomyopathy.
J. Clin. Invest., **103**, R39-R43
- MUNTONI, F., WILSON, L., MARROSU, M.G. (1995)
A mutation in the dystrophin gene selectively affecting Dystrophin expression in the heart.
J. Clin. Invest., **96**, 693-699
- NAM, H.-J., POY, F., SAITO, H., FREDERICK, C.A. (2005)
Structural basis for the function and regulation of the receptor protein tyrosine phosphatase CD45.
J. Exp. Med., **201**, 441-452

- NICHOLAS, R.S., PARTRIDGE, J., DONN, R.P., HAWKINS, C., BOGGIED, M.D. (2003)
The role of the PTPRC (CD45) mutation in the development of multiple sclerosis in the North West region of the United Kingdom.
J. Neurol., Neurosurg., Psych., **74**, 944-945
- NICKENING, G., WOLFF, A., STÄBLEIN, A., PFISTER, H., BÖHM, M. (1999)
Enhanced expression and autoimmunity of recombination signal binding protein-jk in human dilated cardiomyopathy.
Biochem. Biophys. Research Comm., **266**, 432-436
- NOUTSIAS, M., PAUSCHINGER, M., KUEHL, U., SCHULTHEISS, H.P. (2003)
Inflammatorische Kardiomyopathie- Aktuelle Aspekte in der Pathogenese, Diagnose und immunmodulatorischen Therapie.
Cardiovasc., **2**, 34-41
- NOUTSIAS, M., PAUSCHINGER, M., KUEHL, U., SCHULTHEISS, H.P. (2002)
Myocarditis and dilated cardiomyopathy- new methods in diagnosis and therapy.
MMW Fortschr. Med., **144 (14)**, 36-40
- OGIMOTO, M., ARIMURA, Y., MITOMO, K., WOODGETT, J.R. (2001)
Opposing regulation of B-cell-receptor induced activation of mitogen-activated protein kinases by CD45.
FEBS Lett., **490**, 97-101
- OHTA, T., KITAMURA, K., MAIZEL, A.L., TAKEDA, A. (1994)
Alterations in CD45 glycosylation pattern accompanying different cell proliferation states.
Biochemical and Biophysical Research Communication, **200**, 1283
- OLSON, T.M., KEATING, M.T. (1996)
Mapping a cardiomyopathy locus to chromosome 3p22-p25.
J. Clin. Invest., **97**, 528-532
- OLSON, M.T., MICHELS, V.V., THIOBODEAU, S.N., TAI, Y., KEATING, M.T. (1999)
Actin mutation in dilated cardiomyopathy, a heritable form of heart failure.
Science, **280**, 750-752
- ONG, C.J., CHUI, D., THE, H., MARTH, J.D. (1993)
Thymic CD45 tyrosine phosphatase regulates apoptosis and MHC-restricted negative selection
J. Immunol., **152**, 3793
- PAUSCHINGER, M., BOWLES, N.E., FUENTES-GARCIA, F.J. PHAM, V., KUEHL, K., SCHWIMMBECK, P.L., SCHULTHEISS, H.P., TOWBIN, J.A. (1999)
Detection of adenoviral genome in the myocardium of adult patients with idiopathic left ventricular dysfunction.
Circulation, **99 (10)**, 1348-1354

- PAUSCHINGER, M., DOERNER, A., KUEHL, U., SCHWIMMBECK, P.L., POLLER, W., KANDOLF, R., SCHULTHEISS, H.P. (1999)
Enteroviral RNA replication in the myocardium of patients with left ventricular dysfunction and clinically suspected myocarditis.
Circulation, **99** (7), 889-895
- POLLACK, S., LEDBETTER, J.A., KATZ, R., WILLIAMS, K., AKERLEY, B., FRANKLIN, K., SCHIEVEN, G., NEL, A.E. (1991)
Evidence for involvement of glycoprotein-CD45 phosphatase in reversing glycoprotein-CD3-induced microtubule-associated protein-2 kinase activity in Jurkat T cells.
Biochem. J., **276**, 481
- POLLEN, W., FECHNER, H., NOUTSIAS, M., TSCHOEPE, C., SCHULTHEISS, H.P. (2002)
Highly variable expression of virus receptors in the human cardiovascular system-
Implications for cardiotropic viral infections and gene therapy.
Z. Kardiol., **91** (12), 978-991
- REPORT OF THE 1995 WORLD HEALTH ORGANIZATION / INTERNATIONAL SOCIETY AND FEDERATION OF CARDIOLOGY TASK FORCE ON THE DEFINITION AND CLASSIFICATION OF CARDIOMYOPATHIES. (1996)
Circulation, **93**, 841-842
- ROGERS, P.R., PILAPIL, S., HAYAKAWA, K., ROMAIN, P.L., PARKER, D.C. (1992)
CD45 alternative exon expression in murine and human CD4⁺ T cell subsets.
J. Immunol., **148**, 4054
- ROTHSTEIN, D.M., SAITO, H., STREULI, M., SCHLOSSMANN S.F., MORIMOTO, C. (1992)
The alternative splicing of the CD45 tyrosine phosphatase is controlled by negative regulatory *trans*-acting splicing factors.
J. Biol. Chem., **267**, 7139
- SABOURI, A.H., SAITO, M., MATSUMOTO, W., KODAMA, D., FARID, R., IZUMO, S., KSUKU, K., OSAME, M. (2003)
A C77G point mutation in CD45 exon 4, which is associated with the development of multiple sclerosis and increased susceptibility to HIV-1 infection, is undetectable in Japanese population.
Europ. J. Neurol., **10**, 737-739
- SCHRAVEN, B., KIRCHGESSNER, H., GABER, B., SAMSTAG, Y., MEUER, C.S. (1991)
A functional complex is formed in human T lymphocytes between the protein tyrosine phosphatase CD45, the protein tyrosine kinase p56^{lck} and pp 32, a possible common substrate.
Eur. J. Immunol., **21**, 2469

- SCHWINZER, B., WITTE, T., HUNDRIESER, J., EHLERS, S., MOMOT, T., HUNZELMANN, N., KRIEG, T., SCHMIDT, R.E., WONIGEIT, K. (2003)
Enhanced frequency of a PTPRC (CD45) exon A mutation (C → G) in systemic sclerosis.
Genes and Immunity, **4**, 79-81
- SCREATON, G.R., CACERES, J.F., MAYEDA, A., BELL, M.V., PLEBANSKI, M., JACKSON, D.G., BELL, J.I., KRAINER, A.R. (1995)
Identification and characterization of three members of the human SR family of pre-mRNA splicing factors.
EMBO, **14**, 4336
- SINAGRA, G., DiLENARDA, A., BRODSKY, G.L., MATTHEW, R.G., TAYLOR, A., MUNTONI, F. (2001)
New insights into the molecular basis of familial dilated cardiomyopathy.
Ital. Heart J., **2** (4), 280-286
- SIU, B., NIIMURA, H., OSBORNE, J.A. (1999)
Familial dilated cardiomyopathy locus maps to chromosome 2q31.
Circulation, **99**, 1022-1026
- SPEER, W.R., BANKL., H.C., MUNDIGLER, G., KLAPPACHER, G., GROSSSCHMIDT, K., AGIS, H., SIMON, P., LAUFER, P., IMHOF, M. (1994)
The human cardiac mast cell: localization, isolation, phenotype and functional characterization.
Blood, **84** (11), 3876-3884
- STREULI, M., HALL, L.R., SAGA, Y., SCHLOSSMAN, S.F., SAITO, H. (1987)
Differential usage of three exons generates at least five different mRNAs encoding human leukocyte common antigen.
J. Exp. Med. **166**, 1548
- STREULI, M., MORIMOTO, C., SCHRIEBER, M., SCHLOSSMAN, S.F., SAITO, H. (1988)
Characterization of CD45 and CD45R monoclonal antibodies using transfected mouse cell lines that express individual human leukocyte common antigens.
J. Immunol., **141**, 3910
- STREULI, M., SAITO, H. (1989a)
Regulation of tissue-specific alternative splicing: exon-specific *cis*-elements govern the splicing of leukocyte common antigen pre-mRNA.
EMBO, **8**, 787
- TACKENBERG, B., NITSCHKE, M., WILLCOX, N., ZIEGLER, A., NESSLER, S., SCHUMM, F., OERTEL, W.H., HEMMER, B., SOMMER, N. (2003)
CD45 isoform expression in autoimmune myasthenia gravis.
Autoimmunity, **36** (2), 117-121

- TAKEDA, N. (2003)
Cardiomyopathy: molecular and immunological aspects.
Intern. J. Mol. Med., **11**, 13-16
- TAKEDA, A., MATSUDA, A., PAUL, R.M., YASEEN, N.R. (2004)
CD45-associated protein inhibits CD45 dimerization and up-regulates its protein tyrosine phosphatase activity
Blood, **103**(9), 3440-7
- TCHILIAN, E.Z., DAWES, R., RAMALEY, P.A., WHITWORTH, J.A., YULDASHEVA, N., WELLS, R.S. (2002)
A CD45 polymorphism associated with abnormal splicing is absent in African population.
Immunogenet., **53**, 980-983
- TCHILIAN, E.Z., WALLACE, D.L., INAMI, N., LIAO, H.X., BURTON, C., GOTCH, F., MARTINSON, J., HAYNES, B., BEVERLEY, P.C.L. (2001)
The exon A (C77G) mutation is a common cause of abnormal CD45 splicing in humans.
J. Immunol., **166**, 6144-6148
- TCHILIAN, E.Z., WALLACE, D., WELLS, R., FLOWER, D., MORGAN, G., BEVERLEY, P.C.L. (2001)
A deletion in the gene encoding the CD45 antigen in a patient with SCID.
J. Immunol., **85**, 1308-1313
- THOMAS ML. (1989)
The leukocyte common antigen family.
Annu. Rev. Immunol. **7**, 339-69
- THUDE, H., ROSENHAHN, S., HUNGER-DATHE, W., MÜLLER, U.A., BARZ, D. (2004)
A transmembrane protein- tyrosine phosphatase receptor type C (CD45) exon A point mutation (77C to G) is not associated with the development of type 1 diabetes mellitus in a German population.
Eur. J. Immunogenet., **31**, 245-247
- TONG, A., NGUYEN, J., LYNCH, K.W. (2005)
Differential expression of CD45 isoforms is controlled by the combined activity of basal and inducible splicing regulatory elements in each of the variable exons.
JBC Papers in Press, **9/05**, M508123200
- TORIMOTO, Y., DANG, N.H., STREULI, M., ROTHSTEIN, D.M., SAITO, H., SCHLOSSMANN, S.F., MORIMOTO, C. (1992)
Activation of T cells through a T cell-specific epitope of CD45.
Cellular Immunology, **145**, 111

- TROWBRIDGE, I.S., THOMAS, M.L. (1994)
An emerging role as a protein tyrosine phosphatase required for lymphocyte activation and development.
Annu. Rev. Immunol., **12**, 85
- VOGEL, A., STRASSBURG, C.P., MANNS, M.P. (2003)
77 C/G mutation in the tyrosine phosphatase CD45 gene and autoimmune hepatitis: evidence for a genetic link.
Genes Imm., **4**, 79-81
- VORECHOVSKY, I., KRALOVICOVA, J., TCHILIAN, E.S., MASTERMAN, T., ZHANG, Z., FERRY, B., MISBAK, S., CHAPEL, H., WEBSTER, D., HELLGREN, D., ANVRET, M., HILLERT, J., HAMMARSTROM, L., BEVERLEY, P.C. (2001)
Does 77 C → G in PTPRC modify autoimmune disorders linked to the major histocompatibility locus?
Nat. Genet., **29** (9), 22
- WALLACE, D.L., BEVERLEY, P.C.L. (1990)
Phenotypic changes associated with activation of CD45RA⁺ and CD45RO⁺ T cells.
Immunology, **69**, 460
- WALLACE, V.A., PENNINGER, J.M., KISHIHARA, K., TIMMS, E., SHAHINIAN, A. (1997)
Alterations in the level of CD45 surface expression affect the outcome of thymic selection.
J. Immunol., **158**, 3205-3214
- WALLUKAT, G., NISSEN, E., MORWINSKI, R., MÜLLER, J. (2000)
Autoantibodies against the Beta- and muscarinic receptors in cardiomyopathy.
Herz, **25** (3), 261-266
- WANG, H.Y., XU, X., DING, J.H., BERMINGHAM, J.R. (2001)
SC35 plays a role in T cell development and alternative splicing of CD45.
Molecular Cell, **7**, 331-342
- WHY, H.J., MEANY, B.T., RICHARDSON, P.J., OLSEN, E.G., BOWLES, N.E., CUNNINGHAM, L., FREEKE, C.A., ARCHARD, L.C. (1994)
Clinical and prognostic significance of detection of enteroviral RNA in the myocardium of patients with myocarditis or dilated cardiomyopathy.
Circulation, **89** (6), 2582-2589
- WINDHAGEN, A., SÖMNEZ, D., HORNIG-DO, T., KALINOWSKI, R., SCHWINZER, R. (2007)
Altered CD45 isoform expression in C77G carriers influences cytokine responsiveness and adhesion properties of T cells.
Clinical & Experimental Immunology, **150** (3), 509–517

WOOD, J.P., BIEDA, K., SEGNI, M., HERWIG, J., KRAUSE, M., USADEL, U.H., K.
BADENHOOP (2002)

CD45 exon 4 point mutation does not confer susceptibility to type 1 diabetes mellitus or graves`disease.

Europ. J. Immunogenet. , **29**, 73-74

XU, R., TENG, J., COOPER, T.A. (1993)

The cardiac Troponin T alternative exon contains a novel purine-rich positive splicing element.

Mol. Biol. Cell., **13**, 3660

9. Danksagungen

Frau Univ.-Prof. Dr. D. Barz danke ich für die Überlassung des Themas, die Arbeitsmöglichkeiten in ihrem Labor, ihre Anregungen und ihre Geduld.

Herrn Dr. Thude danke ich für seine Unterstützung in allen praktischen Fragen und seine unermüdliche Bereitschaft zur Diskussion.

Herrn Prof. Dr. Figulla danke ich für die Zusammenarbeit seiner Klinik bei dieser Dissertation.

Und zu guter Letzt möchte ich mich bei meiner Familie bedanken:

bei meinen Eltern, weil sie mir kritisches Denken, aber auch Mitgefühl für Hilfsbedürftige nahebrachten und mir eine gute Ausbildung ermöglichten,

und bei meinen Lebensgefährten, der mir computertechnisch geholfen und geduldig das Ende dieser Arbeit erwartet hat.

10. Lebenslauf

Persönliche Daten

Geboren	13.09.1978 in Schmalkalden
Konfession	konfessionslos
Familienstand	ledig
Vater	Umbert Lothar Gerlach, FA für Innere Medizin
Mutter	Heike Gerlach, FÄ für Chirurgie

Schulbildung

1985 bis 1991	Rudolf- Schwarz- Oberschule Bad Liebenstein
1992 bis 1997	Staatliches Gymnasium Bad Liebenstein
1997	Abitur

Hochschulausbildung

09/1997 bis 11/2003 Studium der Humanmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität Jena

Promotion

Seit 10/2003	<u>Thema:</u> Untersuchung der möglichen Assoziation eines varianten CD 45RA-Expressionsmusters auf T-Lymphozyten mit der Entstehung einer idiopathischen dilatativen Kardiomyopathie
--------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Praktisches Jahr

10/2002 bis 02/2003	Pädiatrie (Heliosklinikum Erfurt)
02/2003 bis 05/2003	Innere Medizin (Kreiskrankenhaus Rudolstadt)
06/2003 bis 09/2003	Chirurgie (Sophien- und Hufelandklinikum Weimar)

Bisherige berufliche Laufbahn

01/2004 bis 07/2004	Pathologie (PD K. Rüdiger, Weimar)
07/2004 bis 08/2006	Innere Medizin (Heliosklinikum Gotha)
seit 09/2006	Allgemein- und Viszeralchirurgie (Heliosklinikum Gotha)

Veröffentlichungen:

Human Immunology, 2005 Sept.; 66(9): 1008-12

Thude H., Gerlach K., Richartz B., Krack A., Brenke B., Pethig K., Figulla HR., Barz D.,

No association between transmembrane protein-tyrosine phosphatase receptor type C (CD45) exon A point mutation (77C>G) and idiopathic dilated cardiomyopathy.

Abstract:

Human Immunology, 2005 Sept.; 66(9): 1008-12. Epub 2005, Okt. 7.

Thude H., Gerlach K., Richartz B., Krack A., Brenke B., Pethig K., Figulla HR., Barz D.,

No association between transmembrane protein-tyrosine phosphatase receptor type C (CD45) exon A point mutation (77C>G) and idiopathic dilated cardiomyopathy.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß

- mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist,
- ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,
- mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes unterstützt haben: Frau Univ.-Prof. Dr. D. Barz, Dr. H. Thude,
- die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde,
- Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,
- und ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Gotha, am 22. April 2009

Konstanze Gerlach